

INFORMATION TO USERS

This manuscript has been reproduced from the microfilm master. UMI films the text directly from the original or copy submitted. Thus, some thesis and dissertation copies are in typewriter face, while others may be from any type of computer printer.

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted. Broken or indistinct print, colored or poor quality illustrations and photographs, print bleedthrough, substandard margins, and improper alignment can adversely affect reproduction.

In the unlikely event that the author did not send UMI a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if unauthorized copyright material had to be removed, a note will indicate the deletion.

Oversize materials (e.g., maps, drawings, charts) are reproduced by sectioning the original, beginning at the upper left-hand corner and continuing from left to right in equal sections with small overlaps.

Photographs included in the original manuscript have been reproduced xerographically in this copy. Higher quality 6" x 9" black and white photographic prints are available for any photographs or illustrations appearing in this copy for an additional charge. Contact UMI directly to order.

ProQuest Information and Learning
300 North Zeeb Road, Ann Arbor, MI 48106-1346 USA
800-521-0600

UMI[®]

Université de Sherbrooke

**Caractérisation électrophysiologique et biochimique des
différents canaux ioniques du réticulum sarcoplasmique des
cellules auriculaires humaines**

par

Karel Côté

Département de Physiologie et de Biophysique

Mémoire présenté à la Faculté de médecine

en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M. Sc.)

en physiologie (biophysique)

20 Août 2000



**National Library
of Canada**

**Acquisitions and
Bibliographic Services**

**395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

**Bibliothèque nationale
du Canada**

**Acquisitions et
services bibliographiques**

**395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-61730-0

Canada

Résumé

Karel Côté. Caractérisation électrophysiologique et biochimique des différents canaux ioniques du réticulum sarcoplasmique des cellules auriculaires humaines. Mémoire de Maîtrise, Université de Sherbrooke.

Le couplage excitation-contraction des cardiomyocytes nécessite une augmentation rapide de Ca^{2+} de façon à déclencher les mécanismes moléculaires de contraction. Au niveau ventriculaire, c'est le Réticulum Sarcoplasmique (RS) qui libère le Ca^{2+} qu'il contient via un mécanisme appelé " Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release" (CICR) et qui déclenche la contraction. La Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPase participe à la relaxation en repompant le Ca^{2+} à l'intérieur du RS. La libération de Ca^{2+} du RS s'effectue via des canaux Ca^{2+} appelés Récepteurs à la Ryanodine (RyR). Des canaux Cl^- et K^+ sont aussi présents et serviraient à maintenir une force électromotrice pour les ions Ca^{2+} lors de l'ouverture des RyRs (contrôlée par différents ligands).

La présence d'un RS fonctionnel au niveau auriculaire est un concept très récent. La présente étude démontre la présence de canaux K^+ , Cl^- et Ca^{2+} au niveau du RS auriculaire humain et ovin. Les trois types de canaux rapportés présentent des caractéristiques biophysiques (conductance, probabilité d'ouverture) typiques de celles décrites pour ces mêmes canaux au niveau des cellules ventriculaires. Le RyR auriculaire, tout comme son homologue ventriculaire, est activé par des concentrations mM d'ATP. Les expériences de liaisons spécifiques à la [^3H]-ryanodine ont montré des paramètres biochimiques (K_D , EC_{50} au [Ca^{2+}]) très semblables à ceux déterminés antérieurement sur différentes préparations de mammifères. Cependant la valeur de B_{max} , 4.5 fois inférieure

au niveau des tissus auriculaires humains comparativement aux tissus ventriculaires canins, atteste d'une plus faible densité de RyRs au niveau auriculaire.

Les résultats des expériences de "western blots" utilisant des anticorps spécifiques contre les trois types de RyRs de mammifères ont aussi révélé que les deux types de tissus cardiaques (oreillettes et ventricules) contiennent l'isoforme de type 2 du RyR.

Toutes ces données indiquent qu'il existe un RS fonctionnel au niveau des cellules auriculaires des mammifères supérieurs: humain et ovin. Les similarités biophysiques, biochimiques et immunologiques observées sur ces canaux tendent à accréditer le fait que le couplage excitation-contraction s'effectue de façon similaire à celui décrit au niveau ventriculaire.

Mots Clefs: Oreillette, Humain, Ovin, Réticulum Sarcoplasmique, Canal Ionique, Signalisation Calcique, Récepteur à la Ryanodine.

Table des matières

| | |
|---|-----|
| Table des matières..... | I |
| Liste des tableaux..... | III |
| Liste des figures | IV |
| Liste des symboles et abréviations..... | VI |
| Introduction..... | 1 |
| La contraction cardiaque: du macroscopique au microscopique..... | 1 |
| La libération de Ca^{2+} du RS..... | 3 |
| Interaction entre la Triadine, la Juncine et la CSQ | 5 |
| La pompe Ca^{2+} -ATPase..... | 5 |
| Inactivation des courants calciques du RS..... | 8 |
| Le récepteur à la ryanodine : canal Ca^{2+} du RS..... | 8 |
| Les différents modulateurs des RyRs..... | 11 |
| Les Canaux Cl^- et K^+ du RS | 17 |
| Contexte et objectifs spécifiques du projet..... | 20 |
| Matériel et méthodes..... | 22 |
| Préparation des microvésicules issues du muscle cardiaque | 22 |
| Caractérisation des microvésicules..... | 26 |
| Expérience de liaison à la [^3H]-ryanodine..... | 27 |
| Expérience d'immunobuvardage de type "Western" | 28 |
| Reconstitution membranaire: méthode des Bicouches Lipidiques Planes | 29 |
| Description du montage expérimental..... | 30 |
| Constitution lipidique de la membrane artificielle..... | 30 |
| Méthodologie de la technique | 32 |
| Analyse des signaux | 33 |
| Détermination de la probabilité d'ouverture | 33 |
| Purification du RyR sur gradient continu de sucrose | 34 |
| Produits utilisés..... | 37 |
| Statistique | 37 |
| Résultats..... | 38 |
| Microscopie électronique..... | 38 |
| Biochimie..... | 38 |
| Liaison à la [^3H]-ryanodine sur les différentes fractions enrichies en RS | 38 |
| Expérience de déplacement de la liaison de la [^3H]-ryanodine..... | 39 |
| Effet du Ca^{2+} sur la liaison de la [^3H]-ryanodine | 47 |
| Électrophysiologie | 49 |
| Les canaux Cl^- du RS ovin et humain | 49 |
| Les canaux K^+ du RS ovin et humain | 58 |
| Effet de la 4-Aminopyridine (4-AP) | 59 |
| Reconstitution fonctionnelle des canaux Ca^{2+} du RS..... | 59 |
| Identité de l'isoforme auriculaire du RyR..... | 70 |
| Discussion | 76 |
| Microscopie électronique..... | 76 |

| | |
|---|----|
| Expérience de liaison spécifique à la [^3H]-ryanodine..... | 77 |
| Canaux Cl^- du RS | 80 |
| Canaux K^+ du RS..... | 81 |
| Canaux Calcique du RS (RyR)..... | 84 |
| Immunobuvardage western contre les RyRs | 86 |
| Conclusion | 88 |
| Perspectives..... | 90 |
| Annexe A | 93 |
| Remerciements..... | 94 |
| Bibliographie..... | 96 |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 1- Solutions utilisées dans la préparations des fractions microsomales de coeurs canins et ovins..... | 24 |
| Tableau 2- Cocktail d'inhibiteurs de protéases utilisé dans la préparation des fractions microsomales cardiaques humaines, ovines et canines..... | 24 |
| Tableau 3- Solutions utilisées lors des expériences de liaison spécifique à la [³ H]-ryanodine..... | 28 |
| Tableau 4- Solutions tampons utilisées lors des expériences d'immunobuvardage. | 29 |
| Tableau 5- Différentes solutions utilisées lors des expériences de reconstitutions de canaux ioniques avec la méthode des BLP. | 32 |
| Tableau 6- Tampon de lavage utilisé lors de la solubilisation du RyR. | 37 |
| Tableau 7- Valeurs moyennes des paramètres de liaison à la [³ H]-ryanodine pour différents tissus cardiaques d'espèces variées..... | 48 |

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1- Schématisation du mouvement des ions à travers la membrane du réticulum sarcoplasmique..... | 6 |
| Figure 2- Représentation tridimensionnelle de la molécule de ryanodine..... | 7 |
| Figure 3- Activation du "CICR" et inactivation dépendante du Ca^{2+} du RyR et du canal Ca^{2+} de la membrane de surface dans les myocytes cardiaques. | 10 |
| Figure 4 -Image consensus de RyRs cardiaques et squelettiques. | 11 |
| Figure 5- Schéma de l'interaction entre l'unité α_1 des DHPRs, les RyRs, la triadine et la CSQ..... | 13 |
| Figure 6- Schéma des étapes menant aux préparations microsomales (dont les fractions enrichies en RS) | 25 |
| Figure 7- Exemple de liaison spécifique à la $[\text{}^3\text{H}]$ -ryanodine pour une préparation auriculaire ovine..... | 26 |
| Figure 8- Structure des phospholipides utilisés pour la reconstitution de canaux dans des BLPs..... | 31 |
| Figure 9- Diagramme du dispositif de reconstitution de canaux ioniques dans les bicouches lipidiques planes..... | 31 |
| Figure 10- Exemple d'histogramme d'amplitude utilisé pour déterminer la P_0 d'un canal. | 35 |
| Figure 11- Photo microscopie électronique en transmission de tissus auriculaires humains. | 40 |

| | |
|---|----|
| Figure 12- Photo de microscopie électronique en transmission de tissus auriculaires humains..... | 41 |
| Figure 13- Exemple de liaison à la [^3H]-ryanodine sur les différentes fractions d'une préparation d'oreillettes ovines..... | 42 |
| Figure 14- Courbes moyennes de déplacement par la ryanodine (froide) sur des tissus auriculaires et ventriculaires issues de trois différentes espèces..... | 44 |
| Figure 15- Effet du $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{libre}}$ sur la liaison à la [^3H]-ryanodine sur fractions microsomales cardiaques issus de trois espèces..... | 46 |
| Figure 16- Propriétés biophysiques des canaux Cl^- natifs du RS auriculaire ovin..... | 51 |
| Figure 17- Comportement et propriétés des canaux Cl^- du RS auriculaire humain..... | 53 |
| Figure 18- Caractéristiques biophysiques du canal K^+ du RS auriculaire ovin..... | 55 |
| Figure 19- Propriétés biophysiques et fonctionnelles de canaux K^+ du RS auriculaire humain..... | 57 |
| Figure 20- Effet de la 4-AP sur l'amplitude d'un canal K^+ du RS auriculaire humain. | 61 |
| Figure 21- Comportement du canal Ca^{2+} du RS auriculaire ovin..... | 63 |
| Figure 22- Caractérisation du canal Ca^{2+} du RS auriculaire humain..... | 65 |
| Figure 23- Détermination et analyse des sous-états des canaux RyRs du RS auriculaire humain..... | 67 |
| Figure 24- Activation par l'ATP d'un canal Ca^{2+} du RS auriculaire humain..... | 69 |
| Figure 25- Immunobuvardages "Western blot" réalisés en utilisant des anticorps spécifiques contre les trois isoformes de RyR..... | 73 |
| Figure 26- Courbe d'activation par le Ca^{2+} et l'ATP de canaux RyRs ventriculaires canins. | 74 |

Liste des symboles et abréviations

| | |
|------------------|--|
| 4-AP | 4-Aminopyridine |
| a.a. | acides aminés |
| AMP _C | adénosine 3',5'-monophosphate cyclique |
| ANF | Facteur Natriuritique Auriculaire |
| ATP | Adénosine 5'-triphosphate |
| BLP | Bicouches Lipidiques Planes |
| B _{max} | Liaison spécifique maximale |
| CamKII | Calmoduline Kinase II |
| ChTX | Charybdotoxine |
| CICR | Ca ²⁺ -induced Ca ²⁺ release |
| CSQ | Calséquestrine |
| DHPR | Récepteur aux dihydropyridines |
| DTT | DL-Dithitritol |
| EC ₅₀ | Concentration effective (50% de l'effet activateur) |
| EGTA | ethyleneglycol-bis-(β-amino-ethyl-ether) N,N'-tetraacetic acid |
| E _x | Potentiel d'inversion à l'ion x |
| fem | Force électromotrice |
| FSR | Réticulum Sarcoplasmique libre |
| HEPES | N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid |
| IbTX | Ibériotoxine |
| IC ₅₀ | Concentration effective (50% de l'effet inhibiteur) |
| IP3R | Récepteur à l'inositol 1,4,5-triphosphate |

| | |
|-----------|--|
| K_D | Constante de dissociation |
| MOPS | 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid |
| PC | Phosphatidylcholine |
| PE | Phosphatidyléthanolamine |
| PIPES | Piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid) |
| PKA | Protéine Kinase AMPc-dépendante |
| PKC | Protéine Kinase Calmoduline-dépendante |
| PKG | Protéine Kinase GMPc-dépendante |
| P_o | Probabilité d'ouverture d'un canal |
| PS | Phosphatidylsérine |
| RS | Réticulum Sarcoplasmique |
| RyR | Récepteur à la ryanodine |
| SA | Sinoauriculaire |
| SDS | Sodium dodecylsulfate |
| SDS-PAGE | Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel |
| SERCA | Sarco[Endo]plasmique Reticulum Ca^{2+}/Mg^{2+} -ATPase |
| TEA | Tétraéthylamonium |
| Tris | Trizma base, [tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane] |
| $V_{0.5}$ | Potentiel de demi-activation |
| V_m | Potentiel de membrane |

Introduction

La contraction cardiaque: du macroscopique au microscopique

Le cœur est composé de plusieurs couches fonctionnelles. La plus externe se nomme l'épicaarde, la seconde le myocarde (la partie "musculaire" du cœur) et la plus interne l'endocarde. L'endocarde constitue la continuité de l'endothélium des gros vaisseaux sanguins. Il est constitué de tissu conjonctif et recouvre toute la partie interne du cœur et des valvules. Le cœur se divise en quatre compartiments: deux oreillettes et deux ventricules qui sont reliés via les valvules: bicuspide (côté gauche) et tricuspide (côté droit).

C'est au niveau des oreillettes que se trouve le nœud sinoauriculaire (SA). Celui-ci est considéré comme le premier nœud responsable de la stimulation rythmique du cœur. En effet, il existe d'autres types de cellules (i.e. nœud atrioventriculaire (AV), cellules de purkinje), qui à l'instar de celle du nœud SA, peuvent s'auto-dépolariser et initier la dépolarisation (par conséquent la contraction) du tissu cardiaque contigu. Ces autres centres rythmogènes ne sont pas particulièrement importants en conditions physiopathologiques (Opie, 1998).

L'auto-dépolarisation que subissent ces cellules serait due à un courant entrant appelé I_f –modèle de *DiFrancesco* (DiFrancesco, 1991)– qui s'active en hyperpolarisation et participerait au décours de la pente de la dépolarisation diastolique ce qui amènerait le potentiel membranaire jusqu'au potentiel seuil de ces cellules du nœud SA déclenchant alors un Potentiel d'Action (PA) sinusal qui est subséquentement transmis à l'ensemble du cœur.

Les oreillettes comportent aussi une région appelée appendice auriculaire (Veinot et al., 1997) qui sera importante pour les fins de notre recherche. Cette région serait le vestige d'un des segments de l'oreillette embryonnaire. Ces renflements tissulaires (appendices auriculaires gauche et droite) contiendraient près de 30% de tout le Facteur Natriuritique Auriculaire (ANF) contenu au niveau du cœur (Al Saady et al., 1999). De plus, malgré qu'il fut considéré comme physiologiquement sans implication par le passé, les appendices auriculaires présentent de plus en plus un site d'intérêts pathophysiologiques (ex. formation de *thrombus*) (Al Saady et al., 1999). Il est à noter que cette portion de l'oreillette est excisée lors d'interventions chirurgicales nécessitant une circulation extracorporelle.

Par ailleurs, l'histologie des myocytes cardiaques révèle qu'ils sont bien distincts des autres myocytes; ils sont striés, mononucléés et possèdent de grandes propriétés conductrices. Ils contiennent beaucoup de mitochondries, ce qui leur permet de produire de très grandes quantités d'ATP via des mécanismes aérobiques. La grande conductivité électrique des myocytes cardiaques permet à l'ensemble du cœur de réagir tel un syncytium et avec un très grand "synchronisme" (avec déphasage spatio-temporel) de façon à maintenir sa fonction de pompage la plus optimum.

La grande conductivité entre les cardiomyocytes est assurée par les disques intercalaires. Ces structures sont constituées de desmosomes et de connexons. Les connexons sont des protéines permettant le passage d'ions ainsi que de petites molécules comme du glucose et des acides aminés (Tortora et Grabowski, 1994). C'est par ces structures que le message électrique du PA est transmis aux cellules du cœur de manière extrêmement rapide et coordonnée.

La dépolarisation des cellules auriculaires initie l'entrée de Ca^{2+} au niveau des cardiomyocytes par l'ouverture -des canaux Ca^{2+} de type-L (aussi appelés récepteurs aux dihydropyridines, DHPR) de la membrane sarcolemmale. Cette entrée de Ca^{2+} survient lors de la phase de plateau du PA. Cette entrée de calcium déclenche alors des mécanismes moléculaires menant à la contraction musculaire.

Le couplage excitation-contraction des cellules musculaires cardiaques est similaire, mais néanmoins différent, à celui des muscles squelettiques (Franzini-Armstrong, 1999; Franzini-Armstrong et Protasi, 1997; Leong et MacLennan, 1998a).

Au niveau cardiaque, l'entrée du Ca^{2+} via les canaux Ca^{2+} de type-L induit une libération de Ca^{2+} décuplée provenant des réserves intracellulaires contenues dans le Réticulum Sarcoplasmique (RS). C'est le phénomène d'amplification à la base de l'augmentation transitoire du Ca^{2+} dans le cytosol déclenchant la contraction des myocytes.

L'augmentation transitoire de Ca^{2+} cytosolique ainsi causée sera initiatrice d'un changement de conformation du complexe troponine-tropomyosine qui permettra la liaison de l'actine et de la myosine (Tortora et Grabowski, 1994); les mécanismes moléculaires seront alors engendrés et s'en suivra une contraction de la cellule. Suite à cette contraction Ca^{2+} -dépendante. L'action de la pompe Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase du RS permettra le repompage de Ca^{2+} libre inducteur de la relaxation des cardiomyocytes.

La libération de Ca^{2+} du RS

Au repos, le Ca^{2+} contenu dans le RS est en grande partie lié à la calséquestrine (CSQ), une protéine ayant une faible affinité mais une haute capacité à lier le Ca^{2+} , ce qui lui permet par conséquent d'agir comme "éponge" pour cet ion (Scott et al., 1988; Yano et

Zarain-Herzberg, 1994). La liaison du Ca^{2+} sur le canal calcique du RS induit l'ouverture de celui-ci et permet la libération de Ca^{2+} du RS occasionnant une amplification du signal Ca^{2+} provenant de l'ouverture des DHPRs. Ce phénomène causant une amplification du signal calcique d'environ 10 fois (Sipido et al., 1995) se nomme " Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release" (CICR). Les mécanismes moléculaires menant à la libération des ions Ca^{2+} de la CSQ sont encore ténébreux. Par contre, deux protéines sont potentiellement impliquées dans la signalisation entre le canal calcique du RS et les protéines liant le Ca^{2+} à l'intérieur du RS: la triadine et la junctine.

Cette libération rapide du Ca^{2+} du RS se doit d'être accompagnée par d'autres mouvements de charges de façon à maintenir la force électromotrice qui agit sur les ions Ca^{2+} . La force électromotrice qui agit sur les ions Ca^{2+} est régie par l'équation suivante:

$$\text{Eq. 1} \quad fem = (V_m - E_{\text{Ca}^{2+}})$$

Pour qu'il y ait mouvement de Ca^{2+} , il est donc nécessaire que le potentiel de la membrane reste éloigné en tout temps du potentiel d'équilibre du Ca^{2+} , $E_{\text{Ca}^{2+}}$ (Eq. 2), autrement, la fem s'annulerait et aucun mouvement de Ca^{2+} ne serait possible. Pour contrecarrer cet effet indésirable, des courants Cl^- et K^+ , entre autres, agissent comme co- et de contre- transporteurs de manière à maintenir le V_m éloigné de $E_{\text{Ca}^{2+}}$ (Figure 1).

$$\text{Eq. 2} \quad E_{\text{Ca}^{2+}} = \frac{RT}{ZF} \frac{\ln[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}}{\ln[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}}$$

Z: valence de l'ion ($\text{Ca}^{2+}=+2$)

T: température (K), $20^\circ\text{C} = 295\text{K}$

R: constante des gaz, $R=8.314 \text{ VC/K mol}$

F: constante de Faraday, $F=9.648 \times 10^{-4} \text{ C/mol}$

Interaction entre la Triadine, la Junctine et la CSQ

Différents modèles d'interactions existent entre la triadine et les autres protéines du RS (Franzini-Armstrong et Protasi, 1997). Cette glycoprotéine de 94 kDa possède une très grande quantité de résidus chargés positivement (Figure 5) de son côté lumenale (Knudson et al., 1993a; Knudson et al., 1993b). Ces charges positives interagiraient avec les charges négatives (résidus acides) de la CSQ (Scott et al., 1988) (Yano et Zarain-Herzberg, 1994) ce qui permettrait une "communication" entre la membrane de RS, les canaux calciques du RS et les protéines lumenales séquestrices de Ca^{2+} .

La junctine est une autre protéine ayant des propriétés semblables à celles de la triadine et qui pourrait être impliquée dans ce mécanisme de transduction entre l'extérieur du RS (côté cytosolique) et son intérieur (côté lumenal). En effet, cette petite protéine de 26 kDa possède aussi une grande quantité de résidus chargés positivement (Jones et al., 1995) qui pourraient constituer des sites d'interactions avec la CSQ (Zhang et al., 1997).

La pompe Ca^{2+} -ATPase

La pompe Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase présente au niveau cardiaque est la SERCA 2 (Sarco[Endo]plasmique Reticulum Ca^{2+} Mg^{2+} -ATPase) (Lompre et al., 1994). C'est la protéine présente en plus grandes proportions au niveau du RS (~40%). Elle est principalement localisée sur RS longitudinal (Jorgensen et al., 1982a; Jorgensen et al., 1982b). Sa fonction est de diminuer la concentration cytosolique en ions Ca^{2+} de manière à induire la relaxation. Elle est capable de créer une concentration à l'intérieur du RS de 5-10 mM de Ca^{2+} (Edes et Kranias, 1998). Ce Ca^{2+} sert alors de réserve calcique lors des contractions subséquentes.

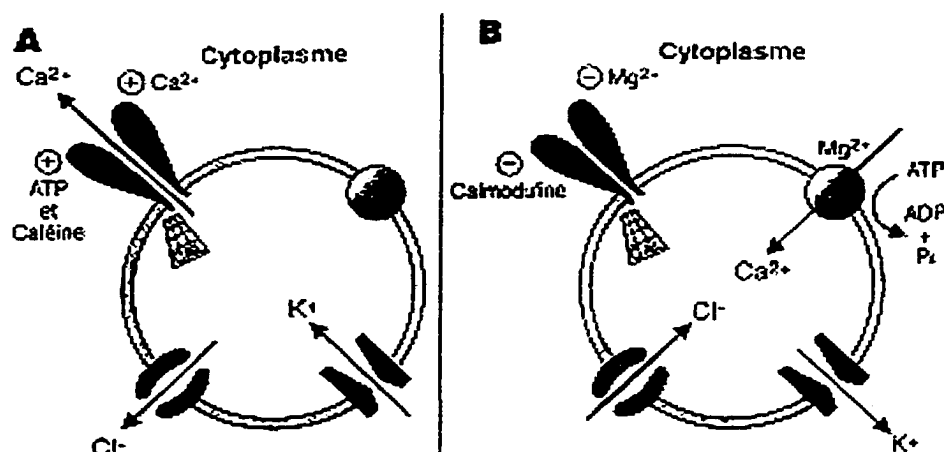


Figure 1- Schématisation du mouvement des ions à travers la membrane du réticulum sarcoplasmique.

A) La libération de Ca^{2+} du RS qui s'effectue selon le gradient de concentration s'accompagne d'un mouvement de contre-charges: le Cl^- se déplace de la lumière du RS vers le cytoplasme. Par contre, les charge K^+ se déplace dans le sens opposé. Ces mouvements d'ions monovalents ont comme conséquence le maintien de l'électroneutralité du système tout autant que la force électromotrice pour le Ca^{2+} à l'interface du RS. **B)** Le repompage des ions Ca^{2+} par l'ATPase du RS voit le mouvement de charges inversé. Ceci permet de rétablir le gradient calcique dans le RS. Ce Ca^{2+} ira se lier à la CSQ. Tiré de (Rousseau et Chabot, 1992).

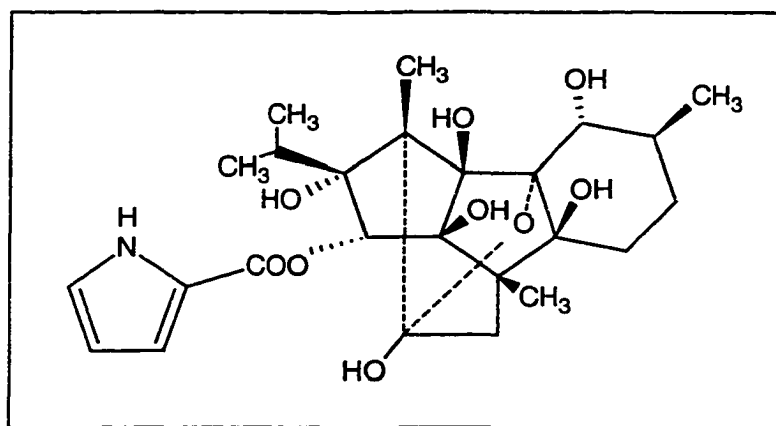


Figure 2- Représentation tridimensionnelle de la molécule de ryanodine.

Voir (Sutko et al., 1997).

L'activité de cette ATPase est modulée par le phospholamban. Le phospholamban est un homopentamère dont le monomère de 52 a.a. a une masse moléculaire de 6 kDa. Un des modèles existant indique que, dans sa forme non-phosphorylée (monomère), cette protéine inhibe la pompe calcique du RS. Sa phosphorylation (agrégation en pentamère) mènerait à une diminution de la quantité de monomères pouvant interagir avec les pompes dans la membrane du RS, ce qui lèverait l'inhibition des pompes $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ (Cornea et al., 1997; Kadambi et Kranias, 1997). D'autres modèles proposent que le pentamère de PLB, une fois phosphorylé, agirait comme un canal laissant pénétrer le Ca^{2+} à l'intérieur de la lumière du RS (Kovacs et al., 1988; Simmerman et al., 1996).

Inactivation des courants calciques du RS

La libération de Ca^{2+} du RS doit être transitoire, car c'est la baisse de Ca^{2+} qui induit la relaxation des myocytes. Un mécanisme d'inactivation par le Ca^{2+} , autant des DHPRs (canaux Ca^{2+}_L) que des RyRs (canaux Ca^{2+} du RS), permet aux pompes $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPases}$ du RS de suffire à la tâche et d'ainsi faire diminuer le Ca^{2+} dans la cellule (Lee et al., 1985). Le Ca^{2+} sortant du RS inhibe alors le courant calcique de type-L de la membrane de surface (Figure 3 A2). Il existe deux mécanismes distincts de rétroactions négatives sur ce courant: le premier est Ca^{2+} -dépendant et l'autre, voltage-dépendant (Masaki et al., 1997; Sun et al., 1997). Cependant, l'aspect physiologique du mécanisme voltage-dépendant est encore mal compris.

Le récepteur à la ryanodine : canal Ca^{2+} du RS

Le canal calcique du RS est aussi appelé le Récepteur à la Ryanodine (RyR). Cette appellation provient de sa capacité à lier la ryanodine, un alcaloïde tiré de la plante *Ryania*

speciosa. Le RyR est un homotétramère de très grande dimension (~29×29×12 nm) (Franzini-Armstrong et Protasi, 1997) dont le monomère aurait un poids moléculaire de ~565 kDa (Sharma et al., 1998). L'observation en microscopie électronique révèle une topologie tétramérique (Figure 4) ressemblant à un trèfle à quatre feuilles "quatrefoil topology" (Lai et al., 1988a; Sharma et al., 1998).

Trois différentes isoformes de la protéine ont été identifiées chez les mammifères: le RyR1, le RyR2 et le RyR3; et deux autres chez les amphibiens et oiseaux : le α -RyR et le β -RyR (Sutko et al., 1997). Le RyR1 constitue la forme de RyR présente au niveau des muscles squelettiques (Marks et al., 1989; Takeshima et al., 1989; Zorzato et al., 1990), le RyR2 est l'isoforme principalement présent dans le muscle cardiaque (Nakai et al., 1990; Otsu et al., 1990) et le RyR3, qui fut découvert dans le cerveau (Hakamata et al., 1992), est présent dans plusieurs types de tissus différents dont: certains muscles squelettiques, le diaphragme (Conti et al., 1996; Murayama et Ogawa, 1997); Picher et al., 1997) et chez les muscles lisses (Murayama et al., 1999).

Le RyR est reconnu pour son énorme segment cytoplasmique (appelé parfois "feet protein"). Cet amas (tel que vu initialement en microscopie électronique) en surface du RS fait office de transducteur entre la membrane sarcolemmale et la partie du RyR insérée dans la membrane du RS. L'interaction peut se faire à deux niveaux. Chez le récepteur des muscles squelettiques (RyR1), il s'agit d'une interaction "physique" entre le RyRs et le DHPRs de la membrane de surface. Il y existe une liaison du RyR1 avec la boucle entre les domaines II-III du DHPR (Leong et MacLennan, 1998b; Lu et al., 1994; Lu et al., 1995). Par contre, les RyR2 cardiaques ne sont pas liés "physiquement" aux DHPRs et cette interaction se fait principalement via un couplage chimique par le Ca^{2+} , i.e. le CICR.

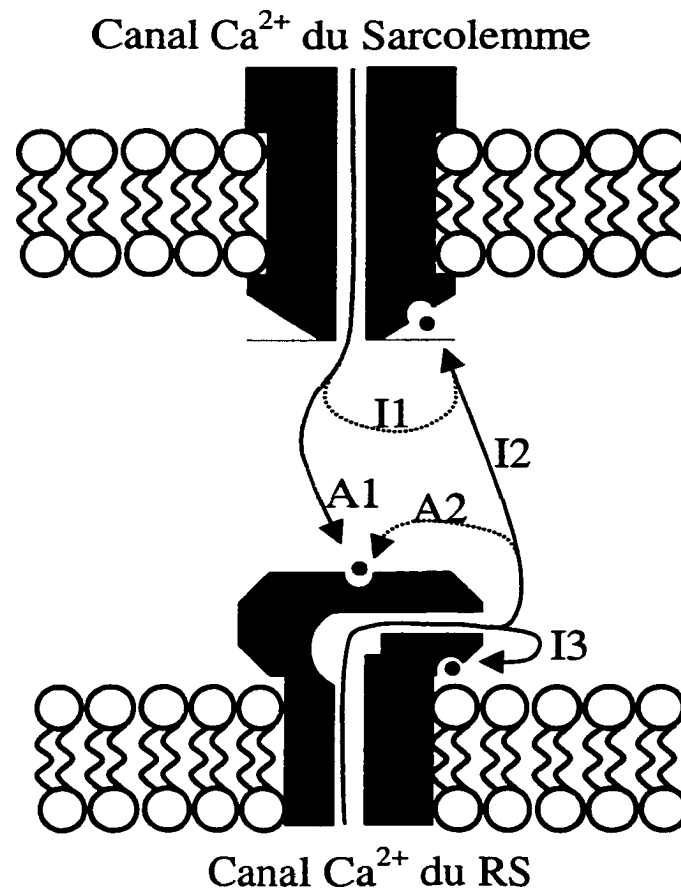


Figure 3- Activation du "CICR" et inactivation dépendante du Ca^{2+} du RyR et du canal Ca^{2+} de la membrane de surface dans les myocytes cardiaques.

Les mécanismes prédominants (flèches en gras) sont l'activation du canal calcique du RS par l'entrée de Ca^{2+} à travers les canaux calciques de type-L de la membrane sarcolemmale (A1), l'inactivation des canaux Ca^{2+} de surface par le Ca^{2+} sortant des réserves du RS (I2) et l'inactivation du canal Ca^{2+} du RS par la sortie de Ca^{2+} de celui-ci (I3) (Sham et al., 1998). Les mécanismes secondaires sont l'activation du canal calcique du RS par la sortie de Ca^{2+} du RS (A2) et l'inactivation du canal calcique de surface par le Ca^{2+} entrant par celui-ci (I1). Adapté de (Adachi-Akahane et al., 1996).

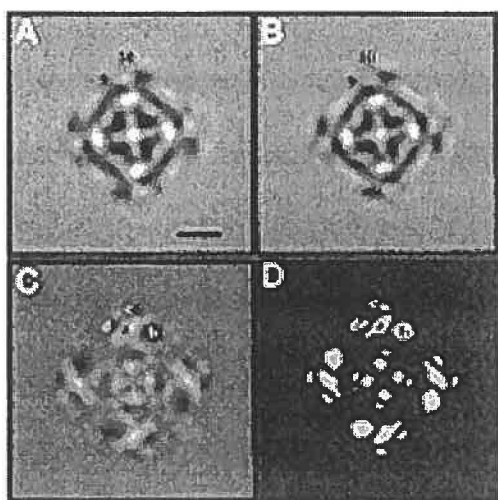


Figure 4 -Image consensus de RyRs cardiaques et squelettiques.

A) Moyenne du RyR2 (n=231). B) Moyenne du RyR1 (n=232). C) Image différentielle obtenue en soustrayant A et B. D). Carte des différences significatives entre le RyR1 et le RyR2. Échelle, 100 Å. (Tiré de Sharma et al., 1998).

Plusieurs modèles de RyR ont été élaborés. Celui qui fait le plus consensus est celui comportant quatre segments transmembranaires (Takeshima et al., 1989) (Figure 5). Cependant d'autres modèles prévoient six segments (Tunwell et al., 1996) ou dix (Treves et al., 1993; Zorzato et al., 1990).

Les différents modulateurs des RyRs

FKBP12 et Sorcine

La FKBP12 et la sorcine sont deux protéines ayant un rôle de modulateur vis-à-vis du RyR (Valdivia, 1998). La FKBP12[†] est une protéine ~12 kDa liant la FK506, une substance immunosuppressive (FK506, rapamycine). La FKBP12 et la sorcine se lient sur

[†] Quelques fois l'isoforme cardiaque de la protéine est nommée FKBP12.6 dû à sa différence de poids moléculaire.

le côté cytoplasmique du RyR. Ces deux protéines ont la propriété d'inhiber la sortie de Ca^{2+} du RyR. La FKBP12 stabiliserait le RyR dans une position complètement fermée. L'addition de FKBP12 a aussi montré une inhibition de l'apparition de sous-états dans des enregistrements de canaux unitaires (Brillantes et al., 1994; Shou et al., 1998). Cet effet suggère que cette protéine coordonnerait les différentes sous unités du RyR (Marx et al., 1998). La sorcine a aussi été considérée comme une protéine pouvant avoir un tel effet stabilisateur (Meyers et al., 1995).

La sorcine est une protéine de 22 kDa, phosphorylable et liant le Ca^{2+} . La sorcine non-phosphorylée inhiberait le RyR; capacité qu'elle perdrait une fois phosphorylé. Ceci serait consistant avec l'effet inotrope positif noté sous une stimulation β -adrénergique (Valdivia, 1998).

Les modulateurs ioniques

Le Ca^{2+} est reconnu comme étant un des principaux modulateurs cytosoliques du "Ca²⁺-release channel" responsable du CICR. Les trois isoformes du RyRs ont une dépendance au Ca^{2+} qui leur est caractéristique (Franzini-Armstrong et Protasi, 1997; Sonnleitner et al., 1998; Xu et al., 1996; Xu et Meissner, 1998). Cet effet du Ca^{2+} est biphasique montrant une activation pour des concentrations μM et une inactivation dans une gamme de concentration mM de Ca^{2+} . La phase d'inactivation n'est cependant pas présente au niveau du RyR2. Cet effet transitoire pourrait s'expliquer par la présence d'un site activateur de haute affinité et d'un, inactivateur, de plus basse affinité (Meissner, 1994). Pour une revue des différents sites de liaison du Ca^{2+} proposés: (Franzini-Armstrong et Protasi, 1997).

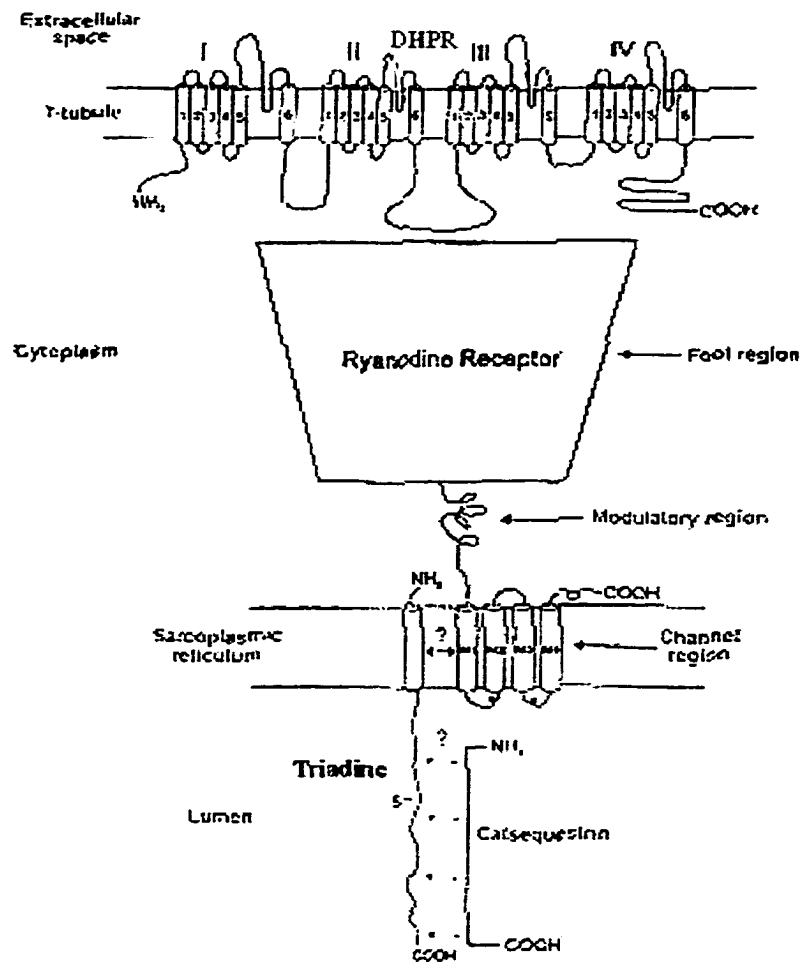


Figure 5- Schéma de l'interaction entre l'unité α_1 des DHPRs, les RyRs, la triadine et la CSQ.

Le "pied" du RyR interagit entre les domaines II-III de la sous-unité α_1 du DHPR. Les DHPRs sont constitués de quatre sous-unités (α_1 , α_2 - δ , β , γ). L'unité α_1 est constituée de quatre domaines (I, II, III, IV), chacun composé de 6 hélices α transmembranaires (1 à 6). Le RyR montre quatre domaines transmembranaires (M1 à M4). Il y aurait une interaction entre la Triadine et le RyR. C'est une interaction électrostatique qui lierait la Triadine et la CSQ. (Adapté de Heiny, 1998).

De plus, plusieurs études indiquent que la concentration de Ca^{2+} luminale aurait une incidence sur la P_0 des RyRs (Gyorke et Gyorke, 1998; Sitsapesan et Williams, 1997; Xu et Meissner, 1998).

Le Mg^{2+} est un autre modulateur ionique important des RyRs. Il déplace la dépendance du RyR envers le Ca^{2+} vers des concentrations plus élevées (Gyorke et Gyorke, 1998; Xu et al., 1996). De cette façon, il inhibe le phénomène de CICR autant au niveau squelettique qu'au niveau cardiaque mais de façon moins efficace pour ce dernier. Son action s'effectue dans les gammes de concentrations $\sim 200 \mu\text{M}$ en présence de $10 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} (Zucchi et Ronca-Testoni, 1997).

Les ions H^+ ont aussi une incidence sur le RyR. Le pH environnant le RyR modifie le comportement du canal Ca^{2+} du RS (Xu et al., 1996). Entre autres, *Rousseau et Pinkos* (Rousseau et Pinkos, 1990) ont montré que les RyRs où régnaient, du côté cytoplasmique de celui-ci, des pH acides (6.5), possédaient de beaucoup plus petites P_0 qu'en pH physiologique (7.2-7.4). Ils ont aussi montré que du côté luminal de la protéine une baisse du pH réduisait la conductance du canal RyR.

Les nucléotides adénines

Les composés comportant un nucléotide adénine (AMP -PCP, ADP, AMPc...) ont aussi une incidence importante sur les RyRs. Ces molécules se lieraient à des sites allostériques du RyR (Zarka et Shoshan-Barmatz, 1993) et viendraient potentialiser l'activation par le Ca^{2+} sur celui-ci. Cette action s'effectue par un déplacement de l' EC_{50} de l'activation du Ca^{2+} sur les RyRs vers des valeurs inférieures (Meissner, 1984).

Il est intéressant de noter que lors de l'ischémie et de l'hypertrophie cardiaque tous ces paramètres peuvent être influencés (Klein et al., 1997; Murphy et al., 1989). Ceci est

indicatif des changements que peuvent amener l'ischémie et l'hypertrophie au niveau du CICR par l'intermédiaire d'effets directs (rapide) et d'effets à plus longs termes tels que la modulation de l'expression des RyRs (Brillantes et al., 1992; Go et al., 1995) et des autres protéines impliquées au niveau du couplage excitation contraction (Mercadier et al., 1990; Takahashi et al., 1992).

Les autres modulateurs

Quantité de modulateurs endogènes et exogènes sont connus pour le canal calcique du RS. La ryanodine est la mieux reconnue, quoi que son mode d'action soit resté longtemps mal connu (Rousseau et al., 1987).

L'action de la ryanodine (Figure 2) est reconnue pour être biphasique. A basses concentrations ($<10\mu\text{M}$), la ryanodine stabilise le RyR dans un état sous-conducteur occasionnant une fuite de Ca^{2+} du RS (Rousseau et al., 1987; Smith et al., 1988) tandis qu'à plus hautes concentrations, elle inhibe complètement le RyR et aucune libération de Ca^{2+} n'est alors possible. Le modèle expliquant ce comportement impliquerait une interaction allostérique négative entre les différentes sous-unités du tétramère que constitue le RyR. La première molécule de ryanodine se lierait à un des monomères du canal avec une haute affinité, subséquemment d'autres molécules de ryanodine viendraient se lier aux autres monomères avec de moins en moins d'affinité. Les changements de conformation qu'induirait ces liaisons séquentielles diminueraient le passage des ions à travers le canal jusqu'à atteindre une inhibition complète (quatre sites de liaisons de ryanodine sur le RyR) (Buck et al., 1992; Pessah et Zimanyi, 1991). Il existe un consensus quasi général sur la localisation approximative du site de liaison de la

ryanodine sur la région C-terminale des monomères du RyR (Rardon et al., 1990; Witcher et al., 1991; Zucchi et Ronca-Testoni, 1997).

Le rouge de ruthénium est une autre molécule couramment utilisée pour la caractérisation de RyR. Cette molécule vient s'insérer dans le pore du canal et bloque celui-ci (Kargacin et al., 1998; Ma, 1993; Meissner, 1984). Le rouge de ruthénium semble sélectif aux RyRs; il est d'ailleurs souvent utilisé pour caractériser les fuites de Ca^{2+} du RS qui sont dépendantes du RyR. Une concentration aussi basse que 20 μM est efficace à induire un blocage.

La caféine est un autre agent utilisé pour l'étude de la libération de Ca^{2+} des réserves intracellulaires, notamment celles du RS. Celui-ci est un activateur du RyR pour des concentrations mM. Il agit potentiellement via deux mécanismes. A de basses concentrations de Ca^{2+} (<2mM), la caféine potentialiserait la dépendance calcique du RyR. Pour de plus hautes concentrations de Ca^{2+} , une activation directe de la caféine sur le RyR surviendrait. Plusieurs autres molécules de la famille des méthylxanthines (dont la caféine et la théophylline) ont aussi un effet de ce genre (Rousseau et al., 1988a). Cependant, vu les concentrations plasmatiques typiques atteintes *in vivo* (~50 μM pour la théophylline), ces molécules sont de bons outils pour l'expérimentation, mais elles s'avèrent moins intéressantes du point de vue thérapeutique (Zucchi et Ronca-Testoni, 1997). D'autre part, il faut aussi considérer qu'elles sont des inhibiteurs non-spécifiques des phosphodiesterases (Lugnier et al., 1993).

Beaucoup d'autres molécules furent exhaustivement étudiées quant à leurs effets sur le RyR. De celles-ci on peut spécifier: la calmoduline, l'héparine ainsi que plusieurs anesthésiques locaux (lidocaine, mépivacaine, tétracaine) et plusieurs toxines:

impératoxine-i et -a, myotoxine-a, ryanotoxine, helothermine etc, (pour une revue voir Zucchi et Ronca-Testoni, 1997).

Sites de phosphorylation

Au niveau du canal Ca^{2+} du RS cardiaque, il existerait un site de phosphorylation sur le résidu Ser-2809 qui est entouré d'une séquence consensus (Witcher et al., 1991). Ce site de phosphorylation serait près d'un site de liaison de la calmoduline. Il existerait une interaction fonctionnelle entre ces deux sites: une phosphorylation antagoniserait l'inhibition de la calmoduline sur le RyR (Witcher et al., 1991). Au niveau cardiaque, il semble que cette phosphorylation s'effectuerait principalement par la Calmoduline Kinase II (CaMKII). La Protéine Kinase A (PKA), la Protéine Kinase C (PKC) et la Protéine Kinase G (PKG) ne semblent pas impliquées selon certains (Hohenegger et Suko, 1993) et le sont selon d'autres (Takasago et al., 1991). Il existe donc une ambiguïté à ce propos dans la littérature.

Au niveau du RyR squelettique (RyR1), le site homologue serait situé au niveau du résidu Ser-2843. Par contre, l'effet de la phosphorylation sur ce site est plutôt controversé. Le RyR1 squelettique montrerait, de la même façon, une phosphorylation par la PKA, la PKC et la PKG (Suko et al., 1993). Néanmoins, il semble certain qu'une phosphorylation modulerait les RyRs.

Les Canaux Cl^- et K^+ du RS

Outre les canaux RyRs, il existe dans la membrane du RS des canaux sélectifs aux anions et cations. Ces canaux ont pour rôle de maintenir le gradient électrochimique en

contrôlant l'entrée et la sortie du Cl^- et du K^+ lors des mouvements rapides de Ca^{2+} à travers la membrane du RS.

Quelques études de canaux Cl^- du RS sont disponibles sur le muscle squelettique (Kourie, 1997a; Kourie, 1997b; Kourie, 1999; Rousseau et al., 1988b) et cardiaque (Holmberg et Williams, 1989; Kawano et al., 1992; Rousseau, 1989). Par contre, aucune structure primaire n'est connue pour ces canaux. Plusieurs types de canaux Cl^- ont été observés au niveau du RS: (Kourie et al., 1996a) dénotent comme types de conductances Cl^- les SCl et BCl, i.e. "Small conductance" et "Big conductance" dans le RS de muscles squelettiques.

Certaines substances organiques furent identifiées comme bloqueurs des canaux Cl^- du RS; elles peuvent ainsi être utilisées comme outils pharmacologiques dans l'étude de ces canaux. Ces substances sont notamment les dérivés stilbene-disulphonate tels le SITS et le DIDS qui bloquent les canaux Cl^- du RS à des concentrations proches du mM. D'autres substances ont possiblement un effet sur ces canaux. (Kourie, 1997a) rapportent des effets du Ca^{2+} et de l'ATP sur des canaux des muscles squelettiques. (Kawano et al., 1992) rapportent aussi un effet activateur de la PKA et du Mg-ATP sur des préparations cardiaques laissant supposer une phosphorylation de ces canaux. Cependant (Decrouy et al., 1995) obtinrent des résultats contrastant avec ceux-ci sur des préparations ventriculaires canines et auriculaires humaines. Ces auteurs ont démontré que l'inactivation des canaux Cl^- du RS auriculaire humain (Decrouy et al., 1995) pouvait être induite par des anticorps dirigés contre le phospholamban, une protéine phosphorylable connue pour moduler l'activité de la pompe Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPase. Ils ont défendu l'idée et démontré indirectement l'association du phospholamban phosphorylé avec le canal Cl^- du RS.

Par contre, le RS ne posséderait qu'un seul type de canal K^+ . La structure primaire de celui-ci n'a pas encore été déterminée quoique son clonage par homologie a peut-être été réalisé par une équipe travaillant sur le clonage d'autres types de canaux K^+ . En théorie, l'expression de son ADNc ne devrait pas permettre d'enregistrer des variations de perméabilité au niveau de la membrane de surface. Les muscles squelettiques (Coronado et Miller, 1980; Hirashima et al., 1991), les myocytes cardiaques (Hill, Jr. et al., 1989; Liu et al., 1991; Shen et al., 1993) et le diaphragme (Picher et al., 1996) ont montré la présence de ce type de canal cationique. Le canal K^+ du RS est perméant à plusieurs types d'ions. Il a été démontré que le canal cardiaque canin pouvait transporter du: $Tl > NH_4 > Cs > K \geq Rb > Na > Li$ (Hill, Jr. et al., 1989). Plusieurs groupes ont aussi pu identifier un état sous-conducteur à ce canal (Hill, Jr. et al., 1989; Hill, Jr. et al., 1990; Liu et al., 1991). Ce sous-état serait intimement lié à l'environnement lipidique du canal (Anzai et al., 1994). Les Kv de hauts numéros (Kv 8.1, Kv9.1, Kv9.2 et Kv9.3) seraient des candidats éventuels car ils n'ont pu être détectés au niveau de la membrane sarcolemmale suite à des transfections (Hugnot et al., 1996; Stocker et Kerschensteiner, 1998). Cependant, il serait envisageable qu'ils représentent des sous-unités régulatrices.

Le canal K^+ du RS serait une protéine canal de 100 kDa (Ide et al., 1991) voltage-dépendante et dont la conductance varie en fonction de la température (Shen et al., 1993). Peu de modulateurs pharmacologiques de ces canaux ont été identifiés. La néomycine B (Ide et al., 1991) et la 4-aminopyridine (Liu et al., 1998) ont été rapportées comme bloqueurs de ce dernier.

Contexte et objectifs spécifiques du projet

La littérature a présenté longtemps l'oreillette comme étant dépourvue de RS fonctionnel. En effet, ce dernier se révéla structuellement différent de celui présent au niveau des cellules ventriculaires mais non moins présent (Bossen et al., 1981; Sommer et Waugh, 1976). Les cellules auriculaires contiennent peu ou pas de tubules T contrairement aux cellules musculaires squelettiques et ventriculaires cardiaques. En effet, Sommer et al. (Sommer et Waugh, 1976) révèlent que les fibres de tissus auriculaires de chiens et de chats ne contiendraient pas de tubules T sauf en de rares exceptions situées en proximité de l'épicarde. Les études chez les souris montrent cependant qu'elles contiendraient beaucoup de RS "libre" (Bossen et al., 1981) et aussi du RS jonctionnel, mais beaucoup moins qu'au niveau des cellules ventriculaires.

Le RS des cellules auriculaires est entouré de structures permettant le couplage et la contraction des oreillettes. (Luss et al., 1999) ont publié une étude exhaustive des protéines nécessaires au couplage Excitation-Contraction (EC). Ils ont pu prouver par Northern blots la présence du mRNA et par Western blots celle de protéines telles la calséquestrine, la troponine C, la pompe Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase (SERCA), la triadine, la junctine et le phospholamban. Or, la protéine la plus importante au niveau de la fonctionnalité du RS est le canal Ca^{2+} du RS –RyR–. D'autres protéines sont caractéristiques de la membrane du RS: ce sont les canaux anioniques et cationiques qui sont aussi présents dans la membrane de cet organel.

Afin de compléter cette étude et de prouver la fonctionnalité du RS, nous avons déterminé la présence du canal Ca^{2+} ainsi que des canaux Cl^- et K^+ du RS des cellules auriculaires humaines. Nous avons caractérisé de manière fonctionnelle ces canaux de la

membrane intracellulaire. De plus nous avons voulu identifier l'isoforme de RyR présent au niveau auriculaire chez différents mammifères afin de comparer structurellement et fonctionnellement les deux types de tissus cardiaques (ventricule et oreillette).

Dans cette optique, trois objectifs spécifiques ont été définis:

- Étudier la liaison à la [3H]-ryanodine sur des fractions microsomales enrichies en RS dérivé des cellules auriculaires de différentes espèces.
- Reconstituer les différents canaux de la membrane du RS dans des Bicouches Lipidiques Planes (BLP) afin de caractériser leurs propriétés biochimiques et biophysiques.
- Comparer les résultats obtenus chez les différentes espèces (humains, moutons et chiens) et en fonction des tissus cardiaques interrogés (oreillette vs. ventricule).

Matériel et méthodes

Préparation des microvésicules issues du muscle cardiaque

Les préparations de microvésicules utilisées lors de ces expériences consistèrent en des fractions microsomales brutes ou enrichies en RS de ventricules canins et d'oreillettes humaines^I et/ou ovines^{II}. Les cœurs de moutons provenaient d'un abattoir local (Viandes Giroux inc. de East Angus), et les cœurs de chiens furent prélevés rapidement et lavés dans une solution de Krebs (voir Tableau 1). Le tissu recueilli, habituellement environ 200 g, est homogénéisé en présence de cinq fois en volume de solution A et d'inhibiteurs de protéases (Tableau 2). L'homogénat fut ensuite centrifugé à 8000×g pendant 20 min de façon à éliminer les débris cellulaires qui se retrouvent au niveau du culot. Le surnageant ainsi récolté a été filtré sur de la gaze et a ensuite été centrifugé de nouveau à 90000×g durant 80 min. Le surnageant contient alors la fraction cytosolique, tandis que le culot contient les microvésicules. Le culot a ensuite été récupéré et resuspendu dans la solution B (fraction brute). Cette solution est un tampon de haute force ionique et de haute osmolarité; elle est utilisée pour maintenir l'intégrité des vésicules lors de la cryocongélation. De plus la haute force ionique sert à dépolymériser les filaments d'actomyosines.

^I Le protocole de recherche utilisant des échantillons auriculaires humains fut analysé et accepté par le comité de déontologie de la recherche chez l'humain de l'institution (CRC9806R1).

^{II} Le protocole de recherche utilisant des tissus de mammifère fut accepté par le comité sur l'expérimentation animale de l'institution CM018.

Les fractions enrichies en RS ont été obtenues en séparant la fraction brute sur un gradient de sucrose discontinu (25%-45%) par une centrifugation de 16 h à 80000×g. Les différentes fractions obtenues correspondent de FI à FVI. Ces fractions ont ensuite été lavées dans de la solution C par une centrifugation de 80 min à 130000×g et les culots ont finalement été resuspendus dans la solution D. Ces différents échantillons furent ensuite congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C.

Le traitement menant aux microvésicules auriculaires humaines est sensiblement identique à celui décrit ci-haut. Les tissus recueillis proviennent de patient subissant une opération nécessitant l'arrêt du cœur et l'installation d'une circulation extracorporelle. Alors, l'appendice auriculaire droit des patients consentants fut réséqué comme le requiert la procédure standardisée et utilisé pour fins de recherches. Les tissus amassés ont été lavés dans du "*Minimum Essential Medium*" (MEM), incubés dans du MEM + 20% glycérol et congelés à l'azote liquide. Lorsque environ 10 g de tissus auriculaires humains étaient accumulés, une préparation était faite de la même façon que pour les tissus cardiaques canins et ovins. La méthode de préparation est résumée dans la Figure 6.

Les patients et patientes qui ont participé à ce projet de recherche (2/3 hommes, 1/3 femmes) étaient tous âgés de plus de 55 ans et certains étaient sous prescription de β -bloqueurs. La participation à ce projet de recherche étant volontaire et anonyme une étude statistique plus exhaustive a été impossible.

| Krebs | Solution A | Solution B | Solution C | Solution D |
|-------------------------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------|
| (mM) | (mM) | (mM) | (mM) | (mM) |
| 118.1 NaCl | 300 sucrose | 300 sucrose | 400 KCl | 300 sucrose |
| 4.7 KCl | 20 K-Hepes | 400 KCl | 5 K-PIPES | 20 Tris-Maleate |
| 1.2 MgSO ₄ | 3 K-EGTA | 0.1 MgCl ₂ | 0.1 K-EGTA | |
| 1.2 KH ₂ PO ₄ | Inhib. de protéase | 1 K-EGTA | 0.1 CaCl ₂ | |
| 25 NaHCO ₃ | | 5 K-PIPES | Inhib. de protéase | |
| 2.5 CaCl ₂ | | | | |
| 11.1 glucose | | | | |
| PH: 7.4 | pH: 7.4 | pH: 7.0 | pH: 7.0 | pH: 7.0 |

Tableau 1- Solutions utilisées dans la préparation des fractions microsomales de coeurs canins et ovins.

| Inhibiteurs de protéases | | | |
|--------------------------|------------------|-------|------------------|
| • 50 | µM de pefabloc | • 2.4 | TIU d'aprotinine |
| • 1 | µM de pepstatine | • 2 | mM de DTT |
| • 1 | µM de leupeptine | • 1 | µM de vitamine C |

Tableau 2- Cocktail d'inhibiteurs de protéases utilisé dans la préparation des fractions microsomales cardiaques humaines, ovines et canines.

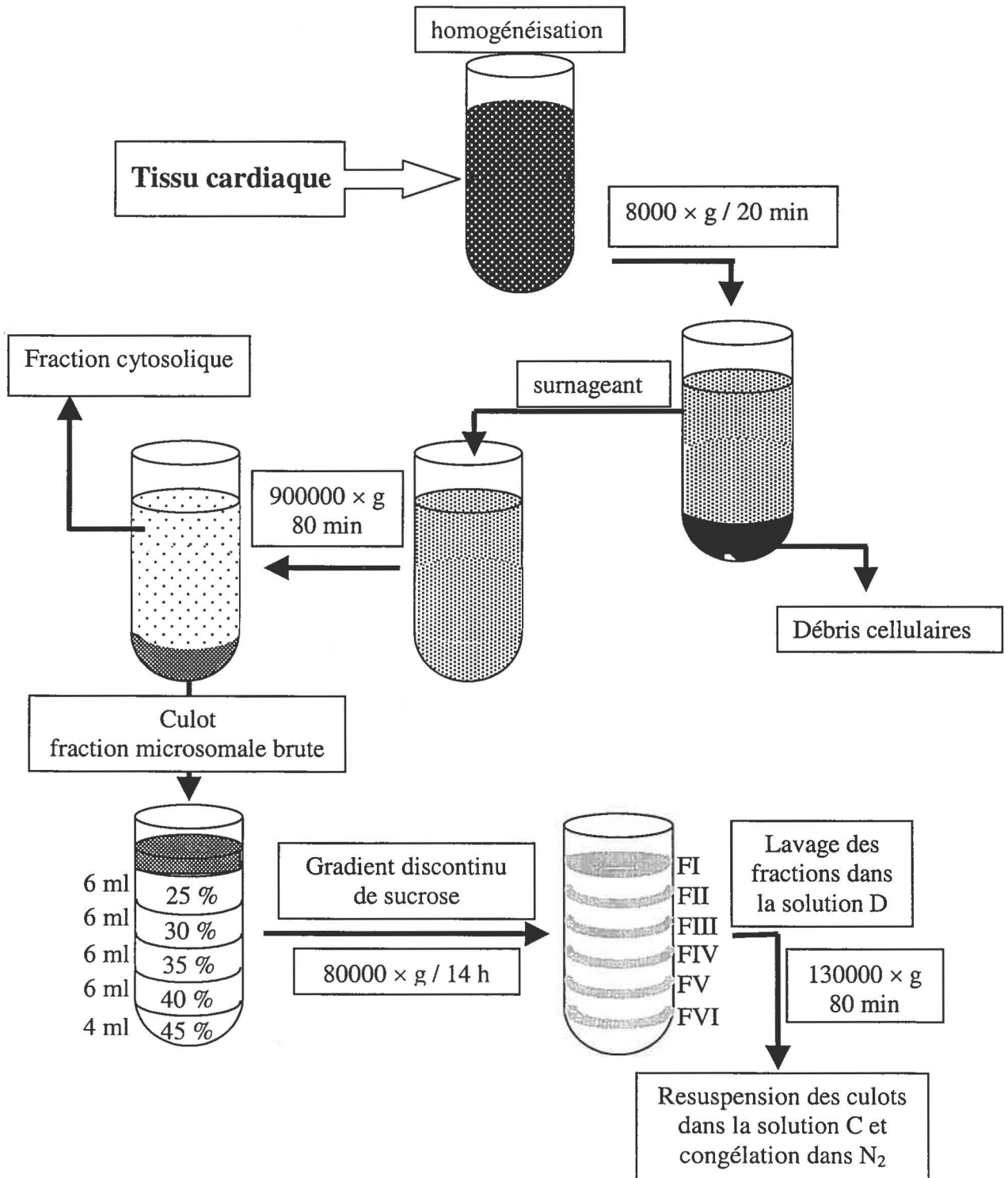


Figure 6- Schéma des étapes menant aux préparations microsomaes (dont les fractions enrichies en RS)

Caractérisation des microvésicules

Le dosage de la concentration de protéines et la liaison à la ryanodine furent effectuées pour les différentes fractions microsomales obtenues. La concentration de protéines fut déterminée par la méthode du Folin-Ciocalteux (Lowry et al., 1951) ou, dans le cas de membranes solubilisées dans du CHAPS, par la méthode DC Bio-Rad (Bio-Rad) qui est compatible avec ce détergent. La liaison spécifique à la ryanodine permet de déterminer quelle fraction est enrichie en RyR et donc en RS lourd.

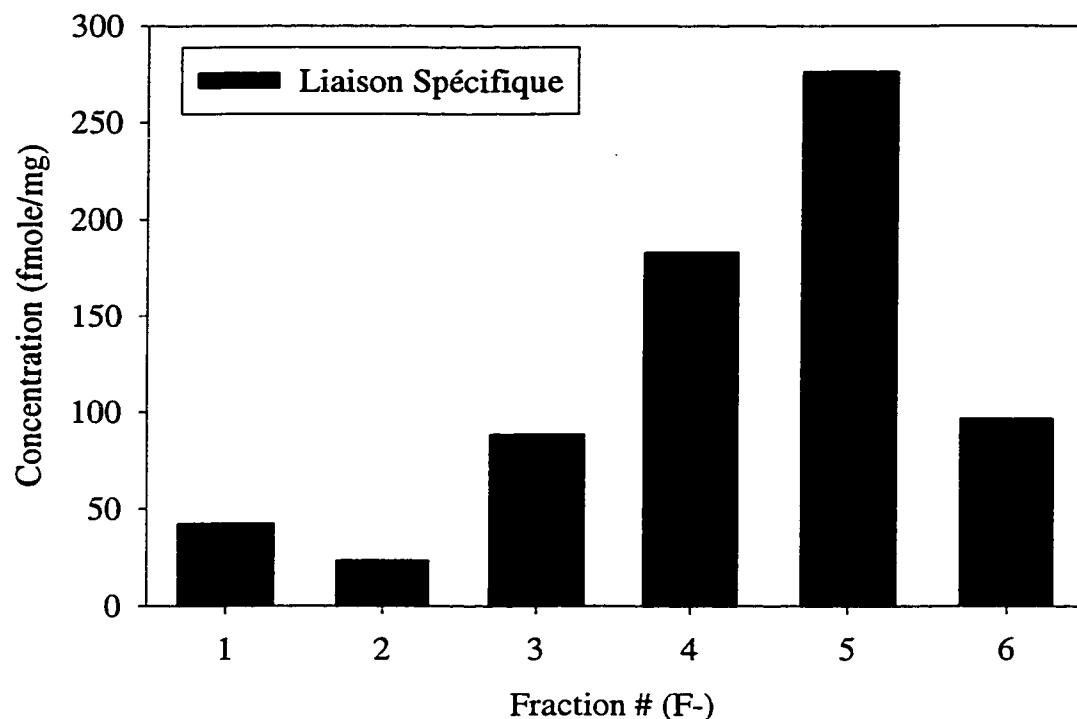


Figure 7- Exemple de liaison spécifique à la [^3H]-ryanodine pour une préparation auriculaire ovine.

L'histogramme montre que les fractions les plus susceptibles de contenir les RyRs sont les fractions 4 et 5. Ces fractions contiennent donc une plus grande proportion de vésicules de haute densité (RS lourd) permettant une plus grande probabilité de fusion dans les BLPs des canaux du RS.

Expérience de liaison à la [³H]-ryanodine

Les expériences de liaison à la [³H]-ryanodine furent effectuées telles que décrites par (Lugnier et al., 1993). Les microvésicules (100 µg de protéines) furent incubées 90 min à 37 °C en présence de 5 nM de [³H]-ryanodine et avec (expérience de déplacement) ou sans (expérience en fonction du Ca²⁺) 5 µM de ryanodine. Ce mélange fut ensuite centrifugé et les culots resuspendus dans le tampon de liaison (Tableau 3) de sorte à laver les microvésicules. La liaison à la [³H]-ryanodine est alors déterminée en mesurant la radiation à l'aide d'un compteur β en présence de liquide à scintillation, car la radioactivité devrait alors se retrouver seulement liée au récepteur du canal Ca²⁺, le RyR.

Les expériences de déplacement ont été, quant à elles, effectuées dans les mêmes conditions (Tableau 3), mais en augmentant la concentration de ryanodine froide (0-10 µM) dans les tubes à essais. Les paramètres dérivés des courbes de déplacement suivaient l'équation de déplacement suivante:

$$\text{Eq. 3} \quad y = \frac{(a - d)}{(1 + (x/c)^b)} + d$$

où a est la valeur asymptotique maximale, b est la pente, c est la concentration à l'IC₅₀ et d est la valeur asymptotique minimale.

La liaison de la [³H]-ryanodine en fonction de la concentration de Ca²⁺ a été testée en présence d'un tampon 0 Ca²⁺, ne contenant aucun Ca²⁺ (Tableau 3), auquel des aliquots de CaCl₂ et de Na-EGTA étaient additionnés de manière à augmenter le Ca²⁺ dans les tubes à essais. La courbe effet-concentration du Ca²⁺_{libre} suivait une relation de Hill telle que décrite par l'Eq. 4.

$$\text{Eq. 4} \quad y = (ax^b / [c^b + x^b]) + d$$

a représente l'amplitude de l'effet, b le coefficient de Hill, c la concentration à l' EC_{50} et d la valeur asymptotique minimale.

| Tampon de liaison | Tampon liaison 0 Ca^{2+} |
|--------------------|----------------------------|
| • 1 M NaCl | • 1 M NaCl |
| • 0.1 mM Na-EGTA | • 20 mM MOPS |
| • 0.15 mM $CaCl_2$ | • 5 mM AMP-Na |
| • 20 mM MOPS | • 2 mM DTT |
| • 2 mM DTT | • 1 mM Na-EGTA |
| • 5 mM AMP-Na | |
| • pH = 7.4 | • pH = 7.4 |

Tableau 3- Solutions utilisées lors des expériences de liaison spécifique à la [3H]-ryanodine.

Expérience d'immunobuvardage de type "Western"

Les protéines sont séparées sur un gel à 6% de type SDS PAGE suite à une solubilisation dans 2% SDS, en conditions non-réductrices avec une région concentratrice à 3%. Ces gels de polyacrylamide furent montés sur des systèmes *mini-protéan* II ou III (Bio-Rad). Les gels furent transférés à 30V durant 15 heures sur des membranes de nitrocelluloses (Bio-Rad). Ces membranes furent ensuite lavées dans une solution tamponnée au *Tris* + 0.1% TWEEN 20 (TBS-T) pour ensuite être bloquée dans du TBS-T + 5% de lait écrémé durant 90 min. La membrane est ensuite lavée de nouveau dans du TBS-T pendant 5 min à trois reprises avant d'être incubée en présence de 1 $\mu g/ml$ de l'anticorps primaire (anticorps RyRs) mis en solution dans du TBS-T. Suite à trois nouveaux lavages, la membrane est incubée 60 min à 23 °C avec l'anticorps secondaire; celui-ci consistant en un antisérum d'âne contenant des anticorps dirigés contre les IgG1 de lapin couplés à la peroxydase (Amersham). Finalement suite à trois derniers lavages

avec du TBS-T tel que précédemment appliqué, la membrane est révélée à l'aide de la trousse *Enhanced Chemiluminescence* (ECL). Ce protocole fut utilisé pour les immunobuvardages utilisant les anticorps contre le RyR1 et le RyR3. Pour ceux utilisant les anticorps contre le RyR2, le TBS-T fut remplacé par du PBS-T; les anticorps primaires et secondaires furent dilués dans du PBS-T + 0.3% de lait écrémé et l'incubation avec l'anticorps primaire fut de 180 min (Les changements ont été fait pour suivre les spécification d'Affinity Bioreagents).

| TBS-T | PBS-T |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • 20 mM Tris • 137 mM NaCl | <ul style="list-style-type: none"> • 137 mM NaCl • 2.7 mM KCl • 8.1 mM Na₂HPO₄ • 1.5 mM KH₂PO₄ |
| pH = 7.6 | pH = 7.2 |

Tableau 4- Solutions tampons utilisées lors des expériences d'immunobuvardage.

Reconstitution membranaire: méthode des Bicouches Lipidiques Planes

La méthode des Bicouches Lipidiques Planes (BLP) est une technique permettant la fusion de microvésicules ou l'insertion de protéines purifiées dans les BLPs et donc la reconstitution de canaux ioniques dans une membrane lipidique artificielle. C'est une technique simple et très intéressante pour l'étude biophysique, biochimique et pharmacologique des canaux ioniques autant intracellulaires que de la membrane de surface; ce qui est un avantage considérable par rapport aux autres techniques qui ne permettent que d'avoir accès aux canaux du sarcolemme (i.e. patchclamp). De plus, cette technique n'élimine pas l'interaction de ces canaux avec certaines protéines associées ou des microdomaines de phospholipides qui se trouveraient en proximité de ceux-ci. Elle donne aussi accès aux deux faces des canaux reconstitués (*trans* et *cis*).

Description du montage expérimental

Le montage expérimental consiste en une chambre expérimentale *cis* (3 ml) et une *trans* (4.5 ml) séparée par un septum possédant un trou de $\sim 250\ \mu\text{m}$ qui permet la mise en place d'une membrane artificielle de phospholipides tel que décrit ci-dessous. Les deux chambres sont reliées à un système d'amplification (amplificateur Dagan 3900, Axon Instrument inc.) à l'aide d'électrodes d'Ag-AgCl (c'est la chambre *trans* qui est mise à terre virtuelle). Ce système contient un filtre permettant de filtrer le signal brut reçu (une fréquence de coupure de 10 kHz fut utilisée). Le signal passe ensuite par un autre filtre passe-bas (1kHz) qui éliminera le bruit non désirable avant l'affichage ou le traitement du signal par l'ordinateur. En parallèle avec ce système, un enregistreur de données (DAT 75 ES-SONY, Unitrade) enregistre sur ruban les signaux bruts. Finalement, une interface Analogue/Digital et un ordinateur permettent de digitaliser et d'analyser les signaux et d'en faire la visualisation à l'écran.

Constitution lipidique de la membrane artificielle

La membrane artificielle de lipides est composée d'un mélange de phosphatidyl-éthanolamine (PE), de phosphatidylsérine (PS) et de phosphatidylcholine (PC) dans des rapports respectifs 3 : 2 : 1. Le solvant utilisé pour ce mélange lipidique est le n-décane à raison de 25 ml / mg de phospholipides. Il est à noter que le PS est un phospholipide chargé négativement (Figure 8).

Une solution de prétraitement est aussi formée des mêmes phospholipides, mais dans ce cas le solvant sera le chloroforme. En apposant une goutte de prétraitement sur le trou de $250\ \mu\text{m}$ de la chambre expérimentale et en la laissant sécher, on réussira à former

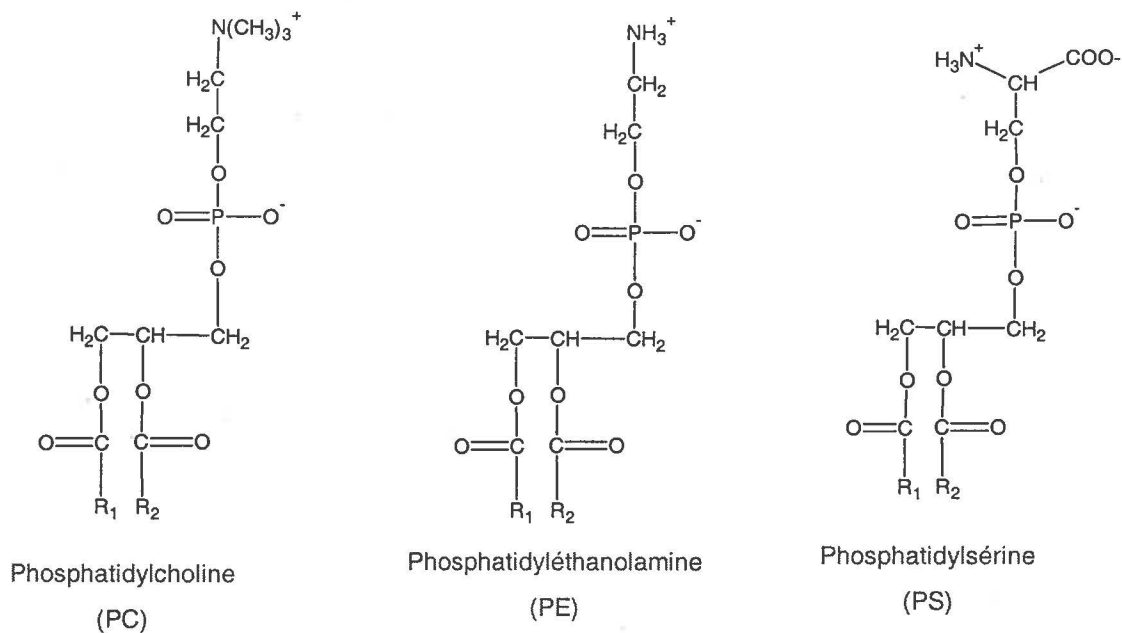


Figure 8- Structure des phospholipides utilisés pour la reconstitution de canaux dans des BLPs.

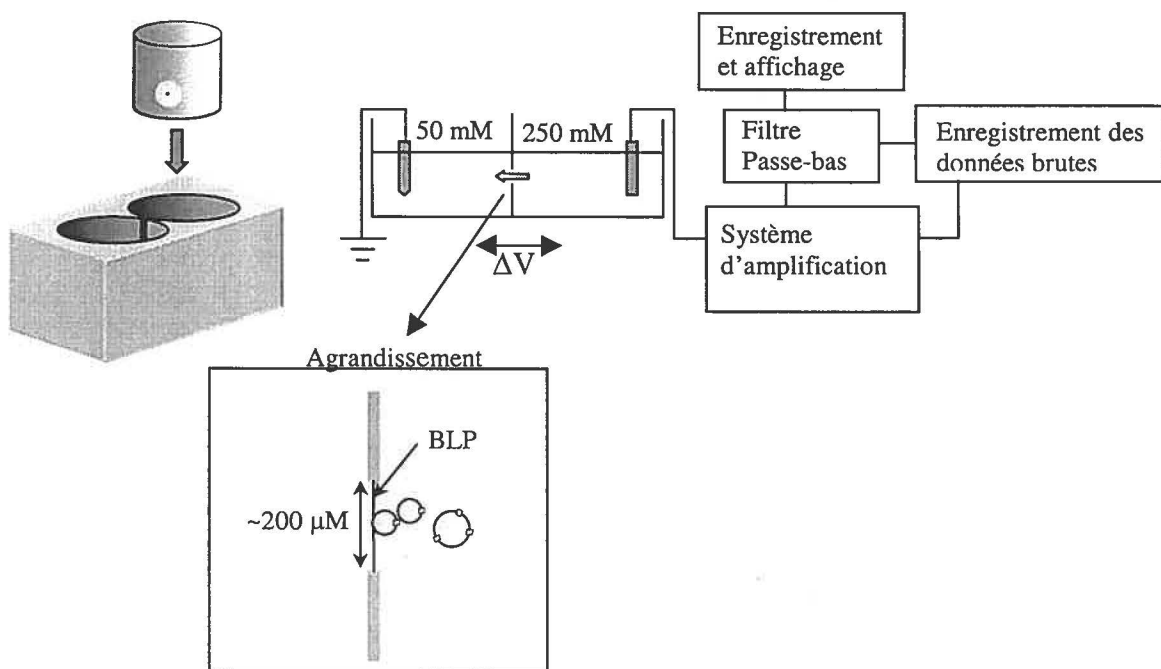


Figure 9- Diagramme du dispositif de reconstitution de canaux ioniques dans les bicouches lipidiques planes.

un anneau de lipides sur le pourtour (*torus*). Cela aidera à peindre plus facilement la membrane artificielle le moment venu (Dumoulin et al., 1998; Salvail et al., 1998).

Méthodologie de la technique

Suite au prétraitement, les chambres expérimentales sont remplies de solutions salines (Tableau 5). Les expériences ont été réalisées à la température de la pièce (20 ± 2 °C). A l'aide d'un pinceau, une mince membrane lipidique est peinte sur le trou. Quand la bicouche est stable, on ajoute un aliquot d'une solution concentrée de manière à créer un gradient ionique aux bornes de la membrane artificielle de phospholipides. Le gradient osmotique aidera la fusion des microvésicules qui sont injectées en proximité de la membrane à l'aide d'un cathéter (habituellement quelques μl suffisent). Suite à une fusion, il est possible d'étudier les paramètres biophysiques et pharmacologiques du canal. La fréquence d'acquisition des données a été de 10 kHz. La $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{libre}}$ dans la solution est de 10 μM –calculée avec programme de *Fabiato* (Fabiato, 1988).

| KCl | KAcétate | CsCl |
|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| • 50 mM KCl | • 50 mM KAcétate | • 50 mM CsCl |
| • 20 mM HEPES | • 20 mM HEPES | • 20 mM HEPES |
| • 109 μM CaCl_2 | • 109 μM CaCl_2 | • 109 μM CaCl_2 |
| • 100 μM EGTA | • 100 μM EGTA | • 100 μM EGTA |

Tableau 5- Différentes solutions utilisées lors des expériences de reconstitutions de canaux ioniques avec la méthode des BLP.

L'étude des canaux fut réalisée en conditions ioniques symétriques et asymétriques. Les expériences en conditions asymétriques sont utilisées pour étudier la sélectivité du canal (emplacement du potentiel d'inversion) et ainsi, tel que mentionné plus haut, aider à la fusion des microvésicules sur la membrane artificielle. L'étude en

symétrique montre la variation des propriétés du canal pour des concentrations ioniques différentes des mêmes ions de part et d'autre du canal et diminue le stress osmotique que doit subir la membrane artificielle le temps de l'expérience. Le CsCl, le KCl et le KAcétate ont été considérés lors de ces expériences. Le CsCl lors de l'étude de canaux sélectifs au Cl^- seul, le KAcétate pour ceux sélectifs au K^+ seul et le KCl pour des canaux sélectifs aux deux types ioniques.

Analyse des signaux

Différents paramètres électrophysiologiques sont étudiés sur des signaux provenant de canaux ioniques. La première relation étudiée est la relation courant-voltage du canal. La pente de celle-ci rend compte de l'aptitude du canal à conduire les ions. Ce paramètre est la conductance unitaire (γ) du canal. Un deuxième paramètre important est la probabilité d'ouverture du canal (P_O). La P_O , le nombre de canaux (N) et la conductance (γ) des canaux nous indiquent la quantité d'ions qui passent à travers les canaux pour une *fem* donnée (Eq. 5).

$$\text{Eq. 5} \quad I = NP_O\gamma(V - E_x)$$

D'autres paramètres que l'on étudie nous informent de la dynamique de fermeture et d'ouverture du canal; il s'agit des temps d'ouvertures (τ_o) et de fermetures (τ_f). Ces paramètres sont utiles pour la conception de modèles cinétiques du canal.

Détermination de la probabilité d'ouverture

La P_O d'un canal unitaire est déterminée en considérant le rapport entre le temps qu'un canal est en position ouverte comparativement au temps total de l'enregistrement pris en compte. Les P_O considérées proviennent habituellement d'enregistrements de 2

minutes. Le calcul se fait à l'aide des amplitudes liées à chaque niveau de la Figure 10. a_0 = état fermé, $a_1 \dots a_n$ = différents états ouverts. Les enregistrements multicanaux sont traités de façons semblables mais on doit se soucier des différents niveaux d'ouverture possibles en utilisant l'équation ci-dessous.

$$\text{Eq. 6} \quad NP_o = \frac{\sum_{i=1}^n i \cdot a(i)}{\sum_{i=0}^n a(i)} \quad 1 \text{ à } n \text{ (niveaux ouverts)}$$

A l'aide du programme Axotape (Axon instruments) nous commençons par numériser et enregistrer les traces dans un fichier. Ensuite des programmes tels que PClamp6 (Axon instruments) ou SCA (gracieuseté de Dr Mark Nelson, Université du Vermont) permet l'analyse de la trace ainsi numérisée. Il est alors possible de créer un histogramme d'amplitudes du courant et de trouver l'aire sous chacune des gaussiennes représentant l'état d'un canal (Figure 10); ceci nous permet de déduire la probabilité d'être dans un tel état.

Purification du RyR sur gradient continu de sucrose

Les vésicules sont lavées dans un "tampon de lavage" (Tableau 6), typiquement 30 mg de protéines dans 25 ml de tampon. Ce mélange est centrifugé à $95000 \times g$ pour une période de 60 minutes. Le surnageant, contenant la myosine et une panoplie de petites protéines, est jeté. Le culot est resuspendu dans 6 ml de tampon de dilution, similaire au tampon de liaison (Tableau 3). Ce volume est ensuite divisé en deux volumes de 3 ml, un

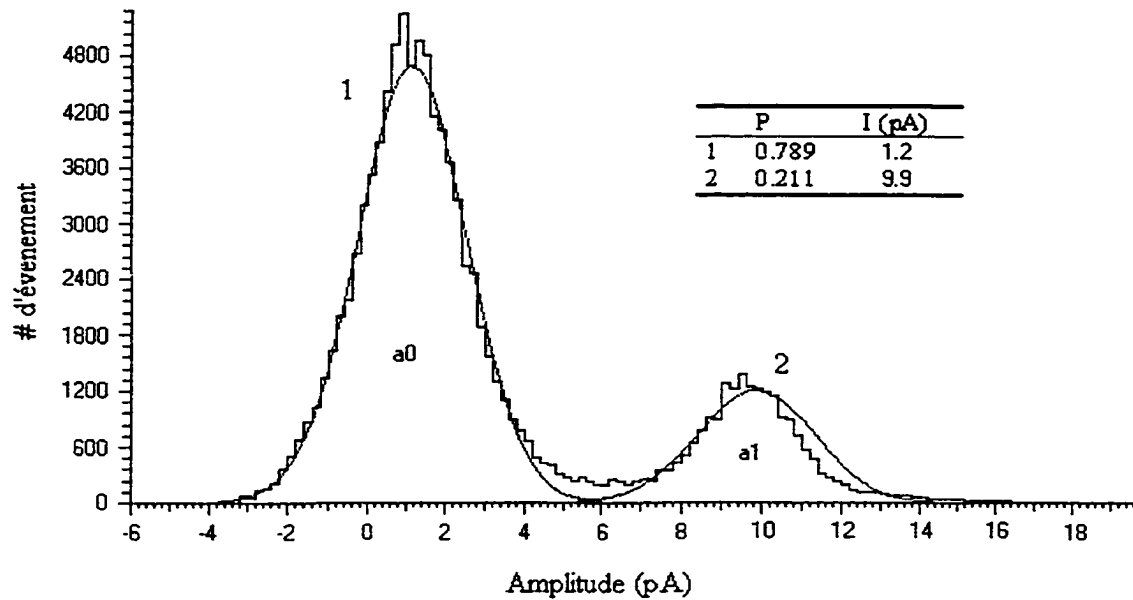


Figure 10- Exemple d'histogramme d'amplitudes utilisé pour déterminer la P_O d'un canal.

L'amplitude du canal est déterminé par: $A=I_2-I_1$ ($9.9 \text{ pA} - 1.2 \text{ pA} = 8.7 \text{ pA}$) et la P_O par:

$$P_O = \frac{a_1}{a_0 + a_1} \text{ (voir equation 4). L'aire de la gaussienne (1) représente, dans ce cas-ci, le}$$

temps passé dans l'état fermé (78,9%) comparativement à l'état ouvert (21.1%) représenté par la gaussienne (2). a_0 : aire sous la gaussienne représentant l'état fermé; a_1 aire sous la gaussienne représentant l'état ouvert.

qui sera marqué avec la [^3H]-ryanodine et l'autre qui ne le sera pas. La fraction destinée à être marquée par de la radioactivité est alors incubée à 37°C pendant 1h30 en présence de 50 nM ($20 \times \text{le } K_D$) de [^3H]-ryanodine.

Ces aliquots de 3.0 ml de la préparation microsomale (avec ou sans [^3H]-ryanodine[†]) auxquels on ajoute 1.14% (p/v) de CHAPS et 3.33 % (p/v) d'azolectine sont, ensuite, agités 30 minutes à 4°C. Cette solution est ensuite centrifugée à $60000 \times g$ pendant 30 minutes. Le surnageant contient alors le récepteur solubilisé et le culot, le matériel non solubilisé. Quelques μl de solubilisât sont prélevés pour le dosage protéique. Il faut noter que le dosage est fait à l'aide d'une trousse Biorad DC qui prend en compte la présence de CHAPS dans nos échantillons, contrairement à la méthode du Folin Ciocalteux.

Suite à ce traitement, les protéines membranaires se voient solubilisées. Ce solubilisât est alors séparé sur un gradient de sucrose continue (5 à 25% p/v) dilué dans le tampon de dilution contenant 1.33% de CHAPS et 3.33% d'azolectine. Le solubilisât est donc déposé sur le gradient de sucrose et est ensuite centrifugé pendant 15h à $80000 \times g$. Les différentes fractions sont récupérées dans des aliquots de 1.4 ml. Les aliquots contenant les RyRs marqués par le ligand radioactif sont ensuite comptés au compteur β de manière à déterminer les fractions où se retrouvent les récepteurs marqués par le ligand.

[†] Suite à la détermination des fractions où sont contenus les RyRs, la technique peut être effectuée sans marqueur radioactif (car effectuée en parallèle).

| Tampon de Lavage |
|---|
| 0.5 M NaCl |
| 20 mM Na ₄ P ₂ O ₇ |
| 20 mM Na ₂ HPO ₄ |
| 0.1 mM Na-EGTA |
| 0.1 mM CaCl ₂ |
| Ajuster pH à 7.0 (HCl) |
| Ajouter inhibiteurs de protéases (Tableau 2) |

Tableau 6- Tampon de lavage utilisé lors de la solubilisation du RyR.

Produits utilisés

Les phospholipides utilisés proviennent de chez *Avanti Polar Lipids* (Alabaster, Al, USA). Trizma (Tris), HEPES (acide N-2-Hydroxyéthylpiperazine-N'-2-éthanesulfonic), MOPS (acide 3-[Morpholino]propanesulfonic), PIPES (Piperazine-N-N'-Bis (acide 2-éthanesulfonic)), les inhibiteurs de protéases proviennent de chez Sigma (St Louis, Mo). Le Péfabloc provient de chez *Roche Diagnostics*. Les anticorps monoclonaux de souris furent achetés chez *Affinity Bioreagents* (Golden, CO). Les anticorps spécifiques contre le RyR1 et le RyR3 ont été gracieusement offerts par le Dr G. Meissner (Université de la Caroline du Nord). Les anticorps spécifiques contre le RyR2 proviennent d'*Affinity Bioreagents*. La [³H]-ryanodine provient de *New England Nuclear* (NEN-Dupont Canada). L'eau utilisée pour les solutions était déionisée en utilisant un système Millipore *Ro-Milli-Q-UF* (18.0±0.2 MΩ/cm²).

Statistique

Les valeurs sont présentées comme: moyenne ± erreur moyenne (SEM).

Résultats

Microscopie électronique

Quelques photos de nos tissus furent prises grâce à Pierre Magny, responsable du service de microscopie électronique. Ces photos ont permis de caractériser les tissus auriculaires humains qui étaient récupérés au début des chirurgies cardiaques. Les deux figures ci-dessous (Figure 11 et 12) nous montrent des coupes d'oreillettes humaines. Les coupes longitudinales montrent bien les filaments composant les fibres musculaires, les stries Z ainsi que le grand nombre de mitochondries que contient ces myocytes cardiaques. Certaines photos permettent aussi d'observer un grand nombre de grains de glycogène.

Les clichés de microscopie électronique des tissus auriculaires ne permettent pas d'observer de tubule T. Comparativement aux muscles squelettiques et de diaphragme, les cellules auriculaires humaines et des autres mammifères supérieurs possèdent très peu de SR jonctionnel (principalement des dyades).

Biochimie

Liaison à la [^3H]-ryanodine sur les différentes fractions enrichies en RS

La Figure 13 représente la liaison à la [^3H]-ryanodine qui fut observée sur les différentes fractions (FI à FVI) d'une préparation de microsomes d'oreillettes ovines. Cette expérience nous sert à évaluer la fraction la plus concentrée en RyR. Celle-ci est celle qui correspond habituellement au RS lourd, i.e. les fractions FIV et FV.

Expérience de déplacement de la liaison de la [^3H]-ryanodine

La Figure 14 représente les études de déplacement de la liaison à la [^3H]-ryanodine par le ligand froid (ryanodine). Les courbes permettent de déterminer et comparer, pour respectivement: les oreillettes humaines (A), les ventricules canins (B) et les oreillettes ovines (insert), les courbes de déplacement et les différents K_d déduits de celles-ci. Des concentrations allant jusqu'à 10 μM de ryanodine furent utilisées pour déplacer 5 nM de [^3H]-ryanodine liée. Les régressions des courbes de déplacement ainsi obtenues montrent des IC_{50} de 4.95, 3.91 et 5.37 nM pour l'oreillette humaine, le ventricule canin et l'oreillette ovine, respectivement. Les expériences de déplacement révèlent donc des courbes ainsi que des valeurs de K_d similaires (Tableau 7) indépendamment de l'espèce ou du tissu (oreillette ou ventricule). Par contre, il fut noté que la liaison non-spécifique, que l'on peut déduire du minimum asymptotique de la courbe, est plus grande dans les fractions enrichies en RS d'oreillettes ovines.

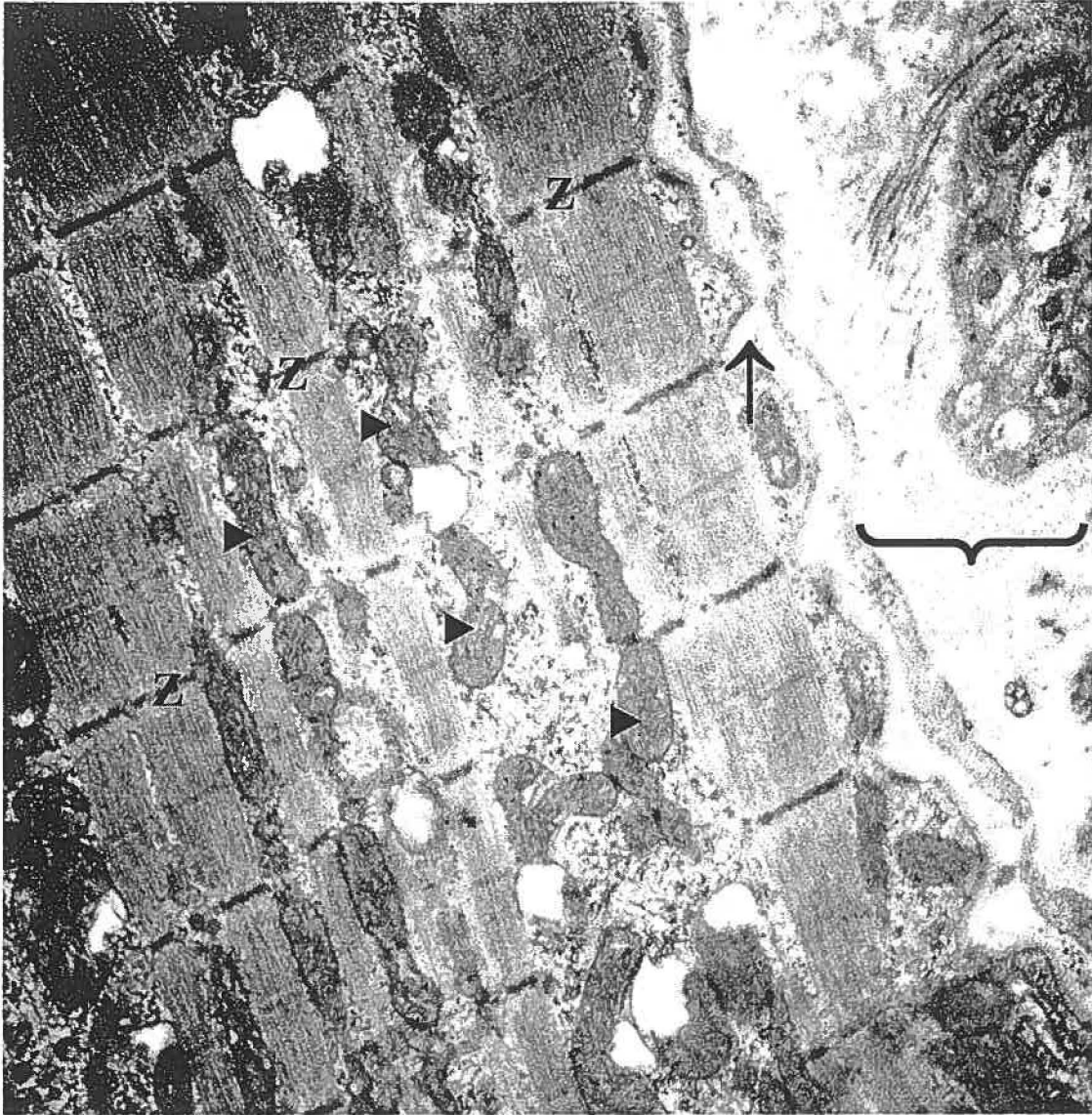


Figure 11- Photo microscopie électronique en transmission de tissus auriculaires humains.

Les ► pointent sur les mitochondries, la flèche indique l'espace entre un myocyte et un fibroblaste tandis que l'accolade délimite ce fibroblaste. On aperçoit bien les myofilaments ainsi que les filaments d'actomyosine. Les stries Z (Z) sont aussi visibles cependant la présence de RS n'est pas évidente au niveau des tissus auriculaires.

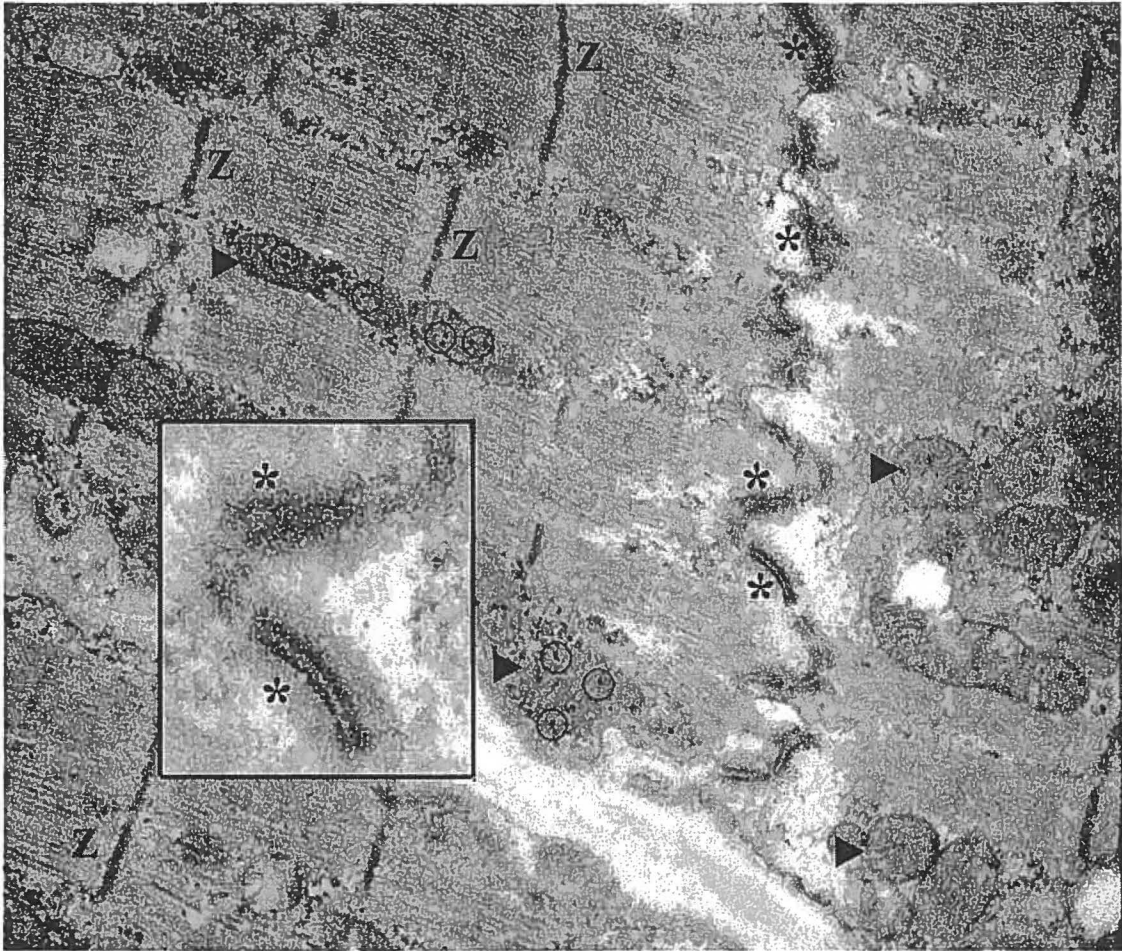


Figure 12- Photo de microscopie électronique en transmission de tissus auriculaires humains.

Les ► pointent sur les mitochondries, les cercles entourent des grains de glycogène et les astérisques indiquent la position des disques intercalaires. Les stries Z (Z) sont aussi visibles. En insert, on présente un agrandissement des disques intercalaires permettant de mieux voir leur structure.

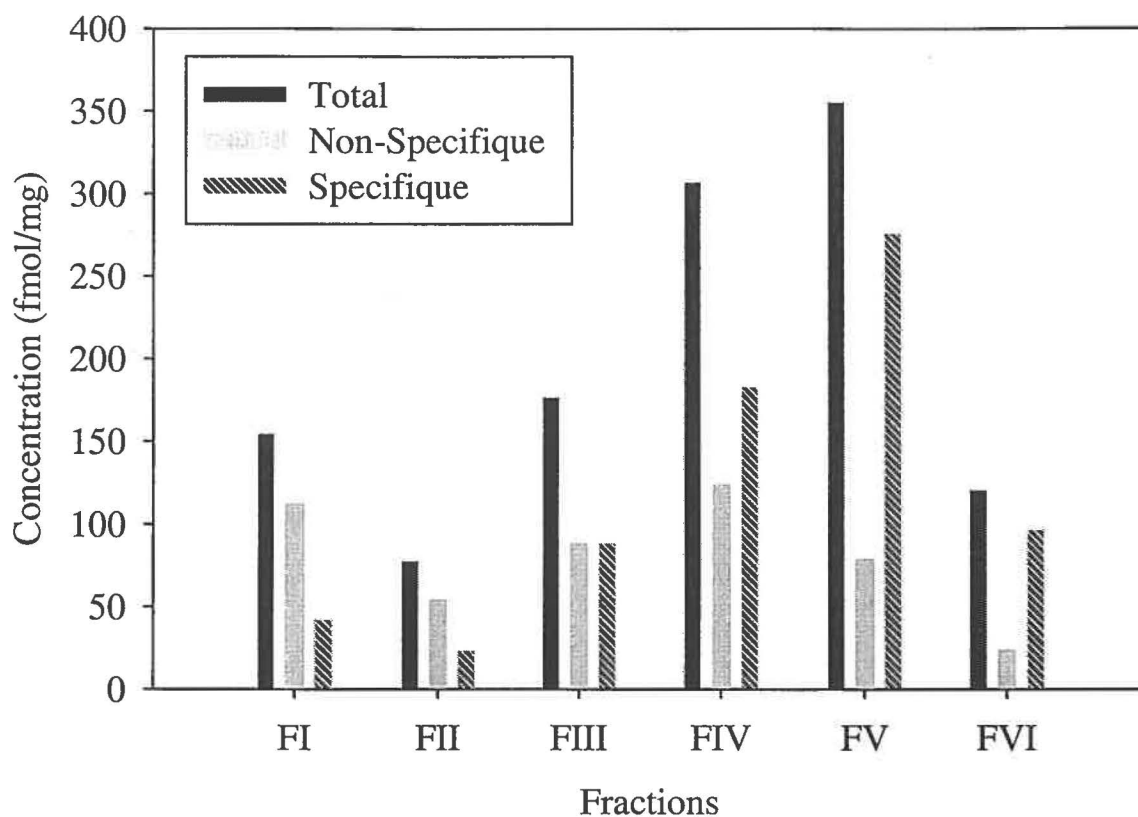


Figure 13- Exemple de liaison à la [^3H]-ryanodine sur les différentes fractions d'une préparation d'oreillettes ovines.

Les fractions correspondent aux positions d'équilibre des microsomes sur le gradient discontinue de sucrose (25% - 45%). La fraction légère est FI; la fraction lourde est FVI. La liaison spécifique à la [^3H]-ryanodine maximale se situe habituellement au niveau des fractions plus lourdes (FIV ou FV). Dans ce cas-ci, la liaison spécifique maximale à la [^3H]-ryanodine est de 276 fmol/mg et se situe au niveau de la fraction FV.

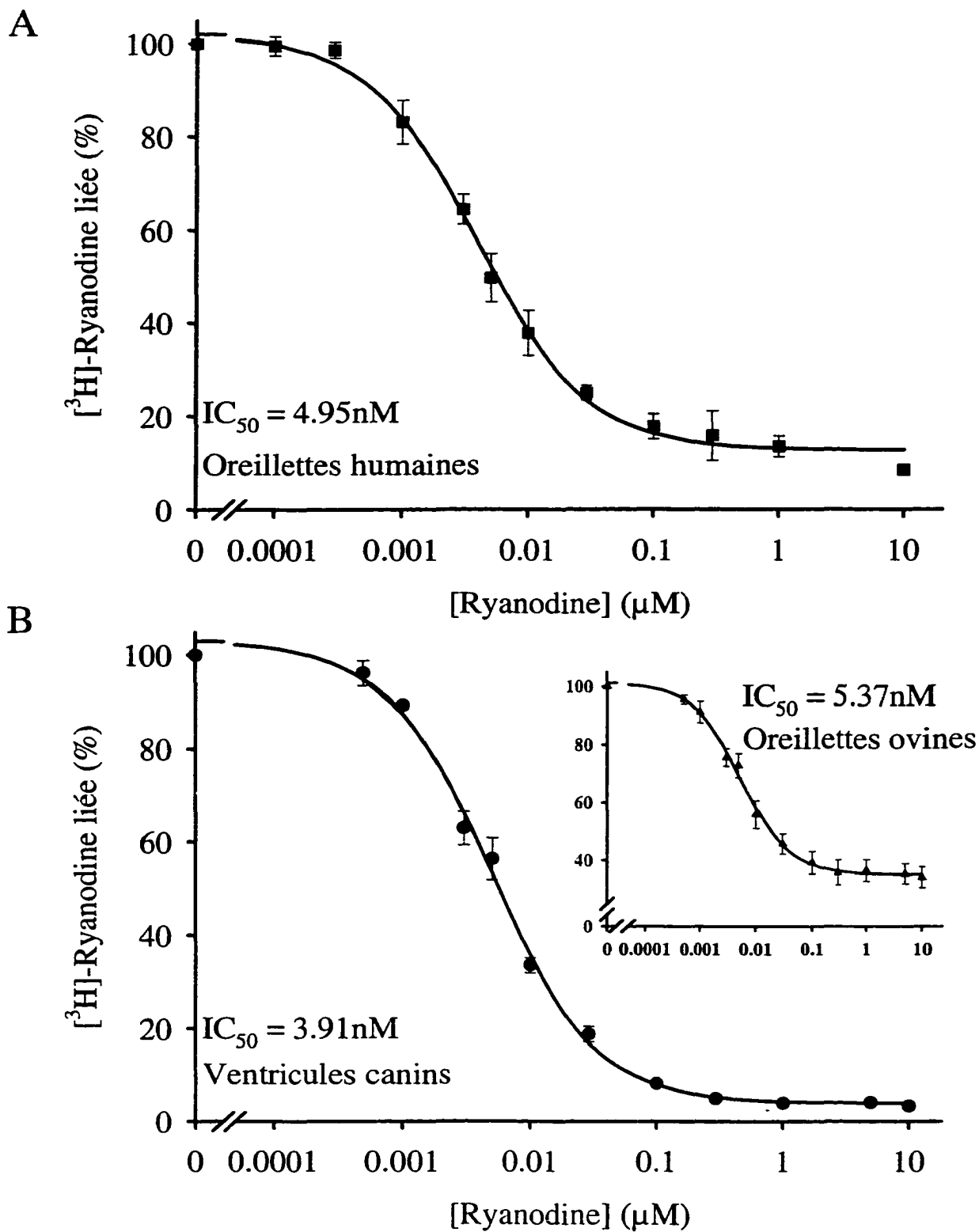


Figure 14- Courbes moyennes de déplacement par la ryanodine (froide) sur des tissus auriculaires et ventriculaires issues de trois différentes espèces.

A) Oreillettes humaines **B)** Ventricules canins, **B, insertion)** Oreillettes ovines. Les valeurs d'IC₅₀ sont de 4.95, 3.91 et 5.37 nM pour les différents échantillons. Les minimums asymptotiques retrouvés, représentatifs de la liaison non-spécifique, furent plus élevés (~35%) au niveau des tissus ovins comparativement aux tissus humains (~13%) ou canins (~4%). Il faut aussi noter l'allure de la courbe très similaire au niveau de la pente, entre autres. Oreillettes humaines (n=3); ventricules canins (n=4) ; oreillettes ovines (n=8).

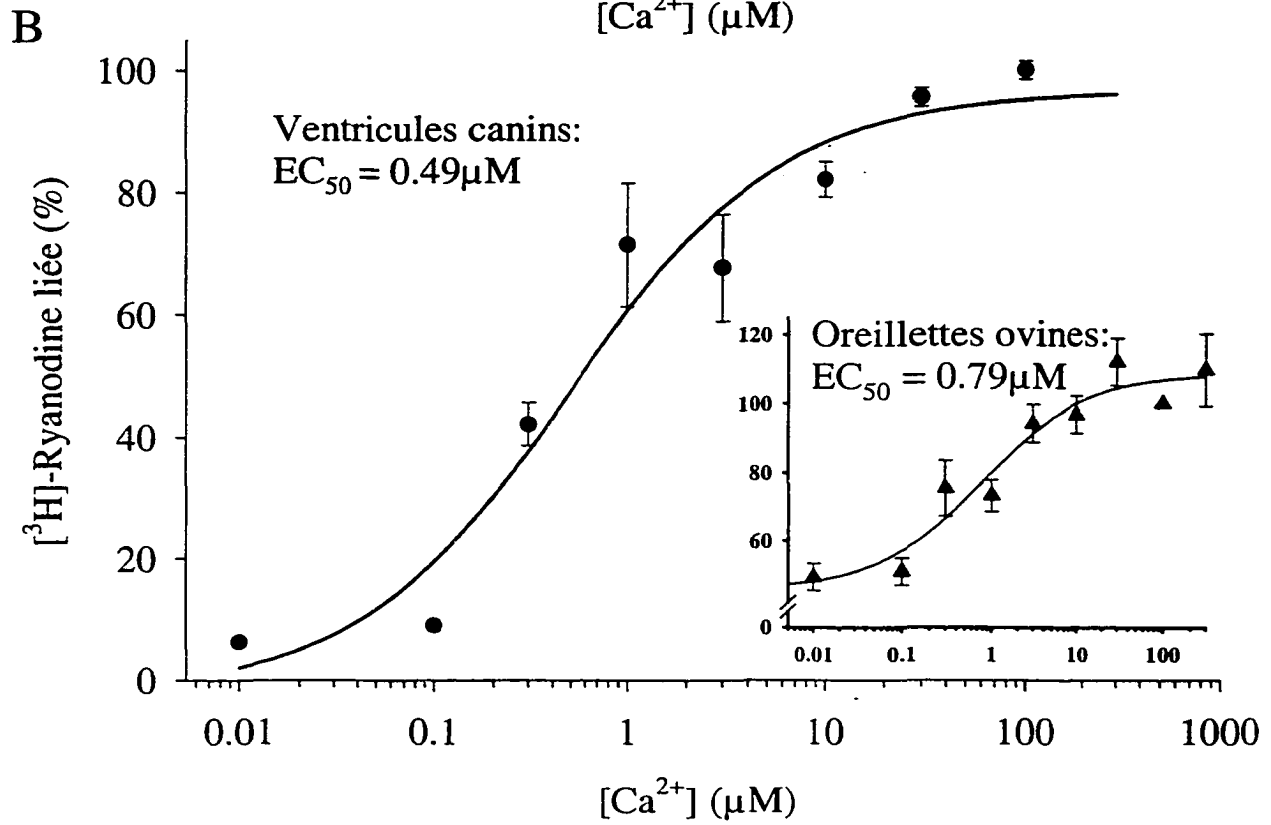
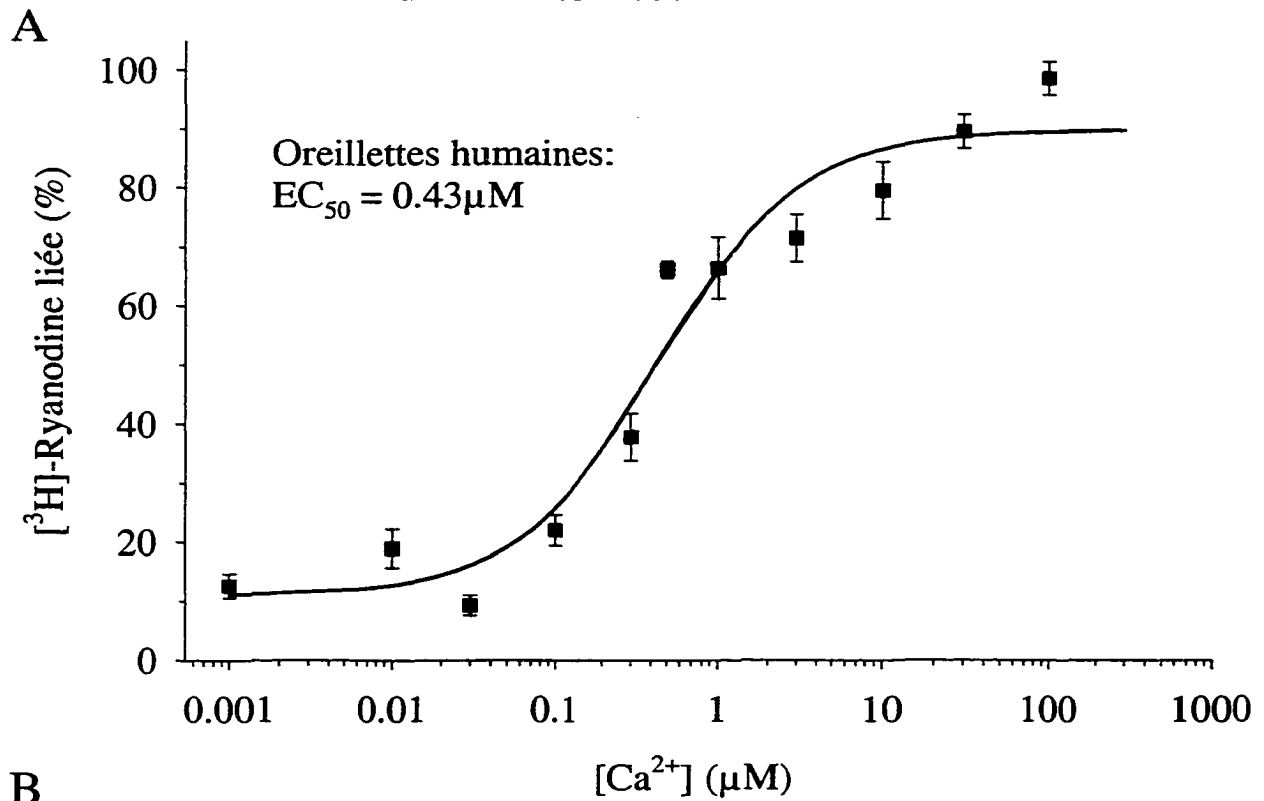


Figure 15- Effet du $[Ca^{2+}]_{\text{libre}}$ sur la liaison à la $[^3H]$ -ryanodine sur fractions microsomales cardiaques issus de trois espèces.

A) Oreillettes humaines, B) ventricules canins, **B, insertion**) oreillettes ovines. Les valeurs d' EC_{50} calculées sont de 0.43, 0.49 et 0.79 μM pour les différents tissus. Les coefficients de Hill dérivés de ces courbes étaient semblables, i.e. 1.00, 0.79, 0.73, respectivement. Les niveaux de liaison non-spécifique étaient similaires à ceux observés sur les courbes de déplacement à la ryanodine (Figure 14). Oreillettes humaines (n=4); ventricules canins (n=3); oreillettes ovines (n=9).

Effet du Ca^{2+} sur la liaison de la $[^3\text{H}]$ -ryanodine

La Figure 15 présente l'effet concentration-dépendante du $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{libre}}$ (de 0 à 300 μM) sur la liaison spécifique à la $[^3\text{H}]$ -ryanodine. L'évaluation des valeurs d' EC_{50} pour la $[\text{Ca}^{2+}]$ fut de 0.43, 0.49 et de 0.79 μM pour les oreillettes humaines, les ventricules canins et les oreillettes ovines, respectivement. Le minimum asymptotique de ces courbes, correspondant à la liaison non-spécifique, s'est avéré supérieur pour les tissus auriculaires ovins comparativement à celui évalué sur le RS des oreillettes humaines et des ventricules canins.

Le Tableau 7 compare les valeurs des paramètres qui ont été déterminés pour les trois préparations utilisées: i.e. la liaison maximale (B_{max}), la constante de dissociation (K_d), les valeurs d' IC_{50} pour la ryanodine, les valeurs d' EC_{50} pour la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{libre}}$ et les coefficients de Hill (nH).

Tableau 7- Valeurs moyennes des paramètres de liaison à la [^3H]-ryanodine pour différents tissus cardiaques d'espèces variées.

| Paramètres \ Espèces | Atrium | | Ventricule |
|--|--------|------|---------------------|
| | Humain | Ovin | Canin |
| B_{\max} (fmol/mg of proteins) ^I | 268 | 280 | 1200 ^[a] |
| K_d (nM) ^{II} | 2.5 | 2.7 | 2.5 |
| IC_{50} (nM), $B = f[\text{ryanodine}]$ ^{III} | 4.95 | 5.37 | 3.91 |
| EC_{50} (μM), $B = f[\text{Ca}^{2+}]$ ^{IV} | 0.43 | 0.79 | 0.49 |
| NH ^V | 1.00 | 0.73 | 0.79 |

^I Le B_{\max} correspond à la liaison spécifique maximale (lors de la saturation des sites de liaison). ^[a] La valeur de B_{\max} pour le ventricule canin est tirée de (Lugnier et al., 1993).

^{II} Le K_d * est la constante de dissociation dérivée de la courbe de saturation (chien) ou évaluée à partir des courbes de déplacement.

^{III} Les valeurs d' IC_{50} correspondent aux concentrations de ryanodine nécessaires pour déplacer la moitié de la [^3H]-ryanodine liée.

^{IV} Les valeurs d' EC_{50} pour le Ca^{2+} correspondent à la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{libre}}$ induisant 50 % de l'effet maximale sur la liaison à la [^3H]-ryanodine. Certains auteurs y réfèrent comme un K_a .

^V Les coefficients de Hill furent dérivés de la pente au point d'inflexion de liaison à la [^3H]-ryanodine en présence de concentrations croissantes de Ca^{2+} .

*Note: les K_d ont été déterminés à partir des courbes de saturations pour le ventricule canin et estimés à la moitié de l' IC_{50} pour les deux tissus auriculaires.

Électrophysiologie

Les mesures électrophysiologiques furent réalisées sur des canaux (K^+ , Cl^- et Ca^{2+}) du RS dérivé des cellules auriculaires ovines et humaines. Ces mesures avaient pour but, d'une part, la caractérisation des microvésicules utilisées dans notre étude et deuxièmement, la caractérisation de ces mêmes canaux.

Les canaux Cl^- du RS ovin et humain

Les canaux Cl^- du RS des cellules cardiaques (ventriculaires et auriculaires) ont fait l'objet d'études par d'autres laboratoires (Kawano et al., 1999; Kourie et al., 1996b; Kourie, 1999; Tanifuji et al., 1987) et par notre laboratoire (Decrouy et al., 1995; Decrouy et al., 1996; Rousseau, 1989). Les expériences réalisées dans le cadre de ce travail étaient plus un contrôle de la qualité et de l'uniformité des préparations qu'une étude intensive des canaux Cl^- du RS.

La Figure 16 représente des enregistrements typiques (A) et la dépendance au voltage (B) de canaux Cl^- du RS de tissus auriculaires ovins. Ce type de canal est illustré dans des conditions asymétriques de KCl 50 / 250 mM *trans* / *cis* pour des potentiels de 0 mV et -50 mV. La courbe I-V montre une conductance de 61 pS en conditions asymétriques de KCl 50 / 250 mM *trans* / *cis* et de 65 pS en conditions symétriques de KCl 250 / 250 mM *trans* / *cis*. En conditions asymétriques, le potentiel d'inversion extrapolé est positif, ce qui atteste de la sélectivité anionique de ce type de canal.

La Figure 17 montre des enregistrements typiques de canaux Cl^- du RS auriculaire humain (A et A'), des courbes I-V en différentes conditions ioniques de ce

A**50 / 250 mM KCl *trans* / *cis*, 0 mV****-50 mV**

2 pA
200 ms

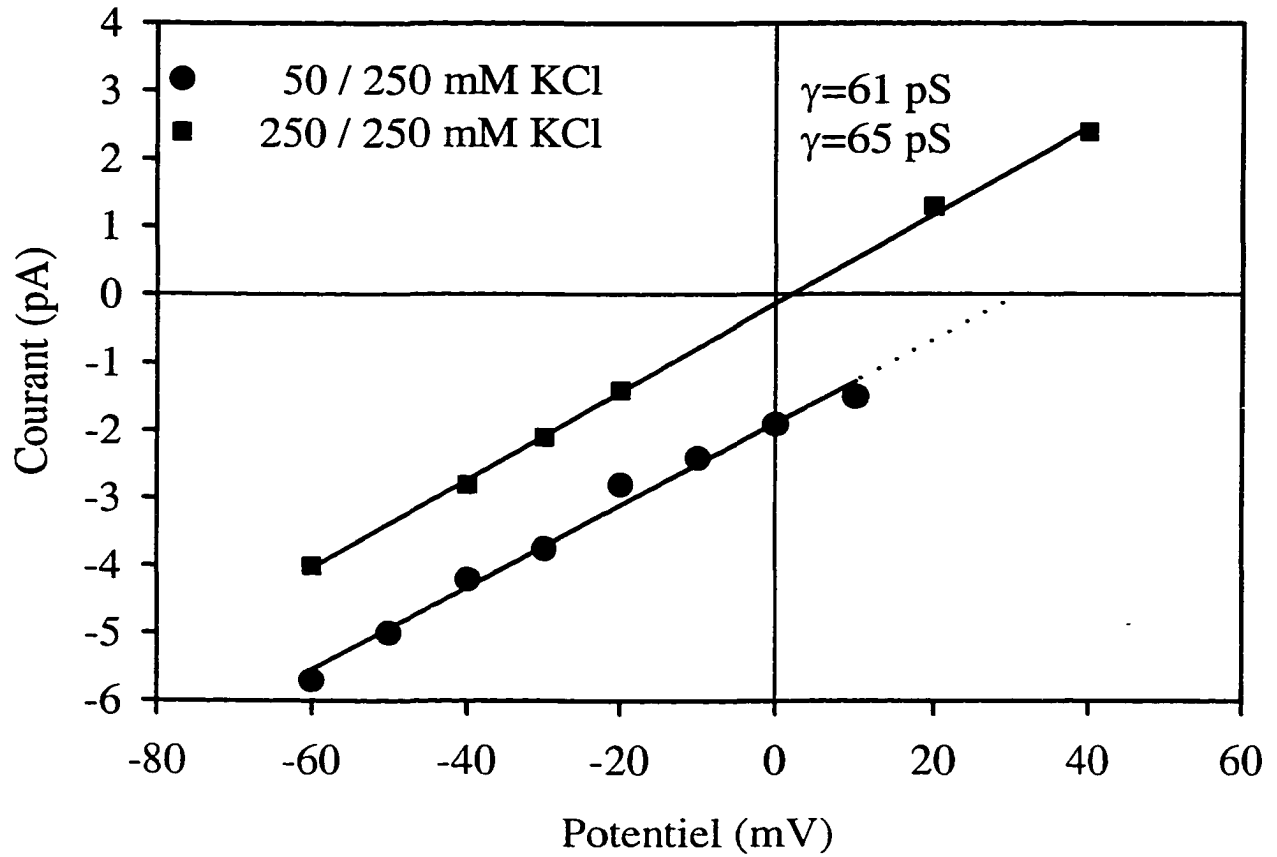
B

Figure 16- Propriétés biophysiques des canaux Cl^- natifs du RS auriculaire ovin.

A) Enregistrements typiques d'un canal Cl^- unitaire du RS à deux potentiels en conditions asymétriques de KCl. **B)** Courbe I-V de ce canal en conditions symétriques et asymétriques de KCl dont les conductances respectives sont de 65 pS ($n=1$) et de 61 pS ($n=1$). **C** ► état fermé du canal; **O** ► état ouvert du canal.

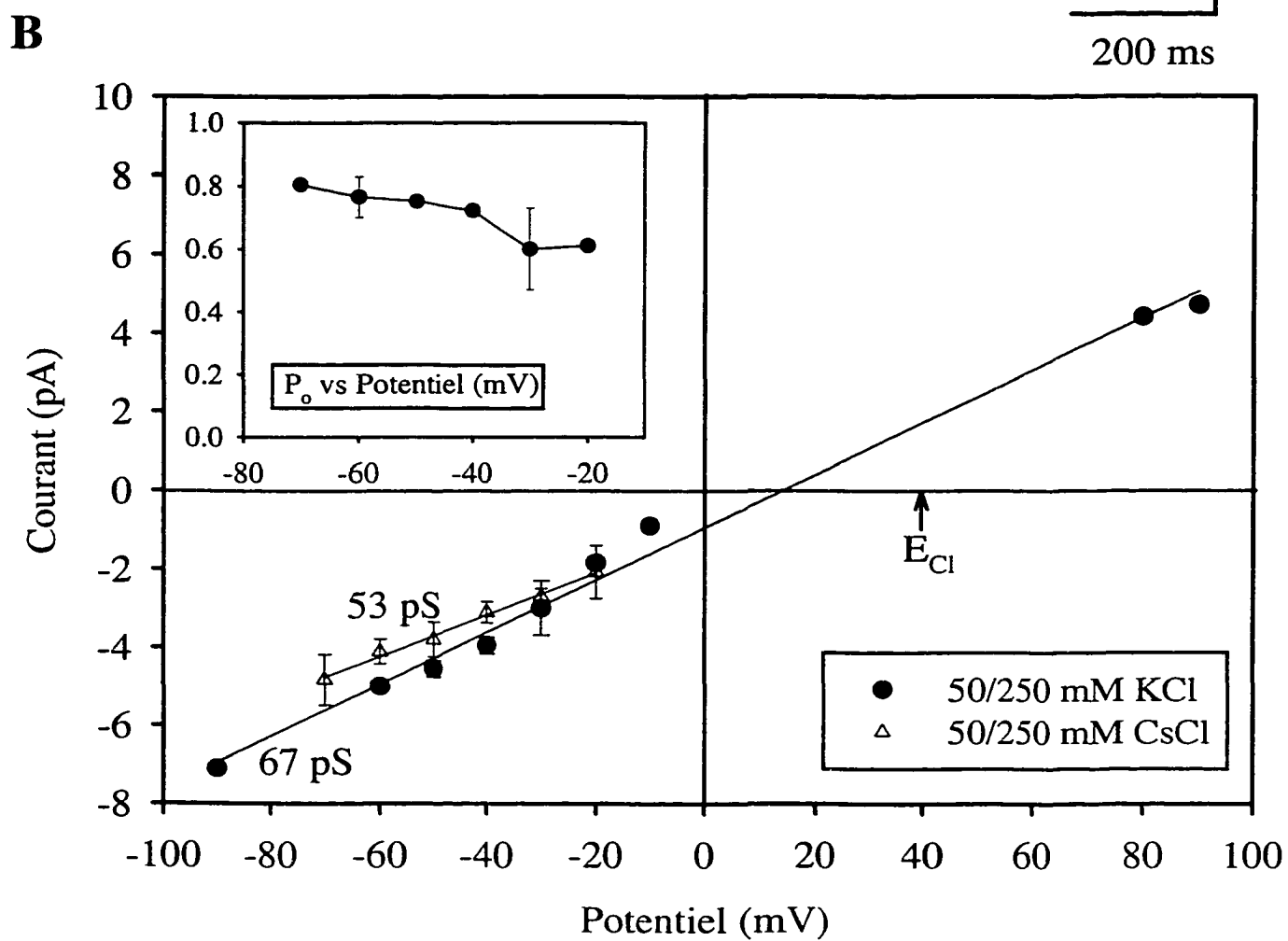
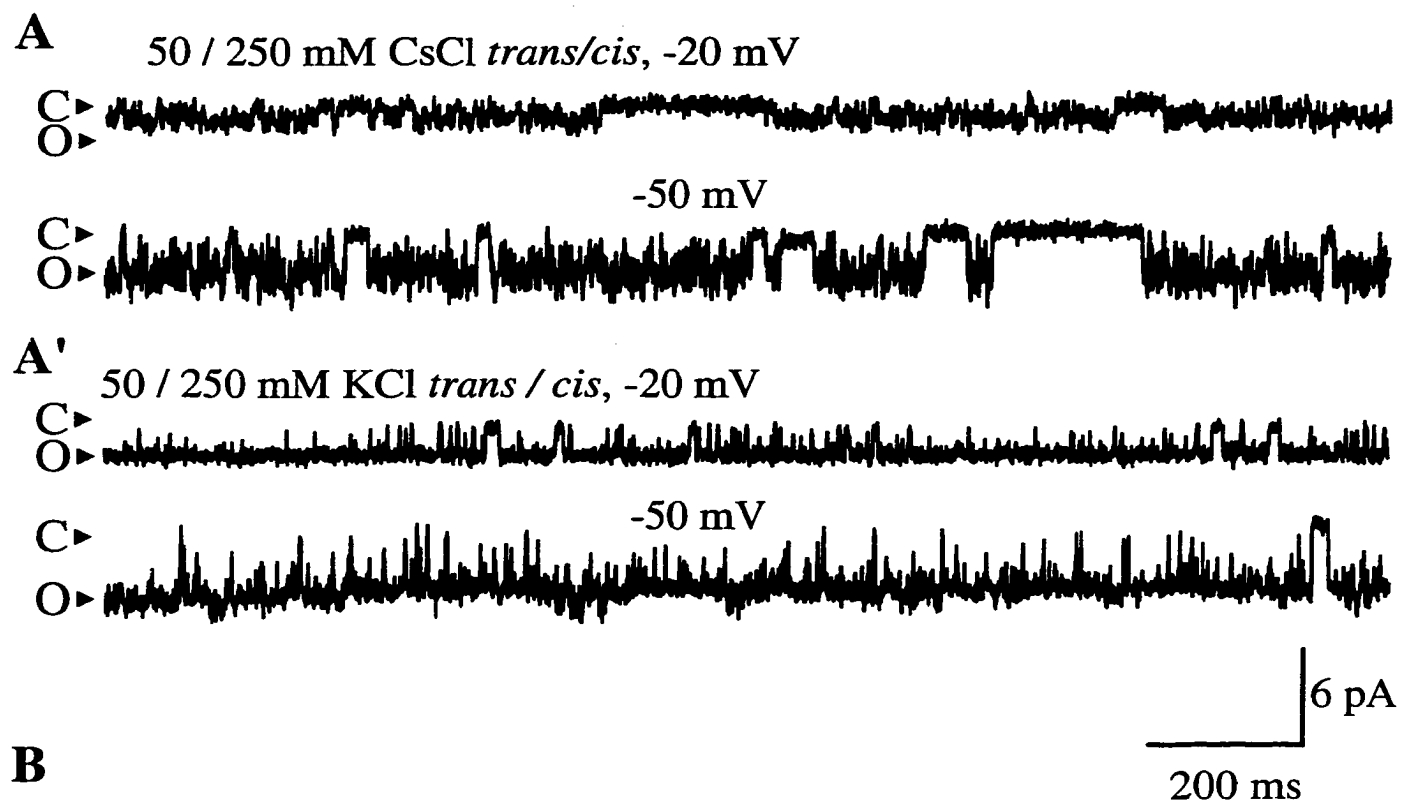


Figure 17- Comportement et propriétés des canaux Cl^- du RS auriculaire humain.

A) Enregistrement caractéristique de canaux Cl^- du RS humain à deux potentiels, en conditions asymétriques 50 / 250 mM CsCl et **A')** 50 / 250 mM KCl. **B)** Courbe I-V de ce type de canal en conditions asymétriques de CsCl ($4 \leq n \leq 5$) et de KCl ($1 \leq n \leq 5$). Les conductances dérivées de ces courbes sont de 53 pS et 67 pS, respectivement. **B, insertion)** P_O du canal Cl^- en conditions asymétriques de KCl en fonction du potentiel (de -70 mV à -20 mV). **C** ► état fermé du canal; **O** ► état ouvert du canal.

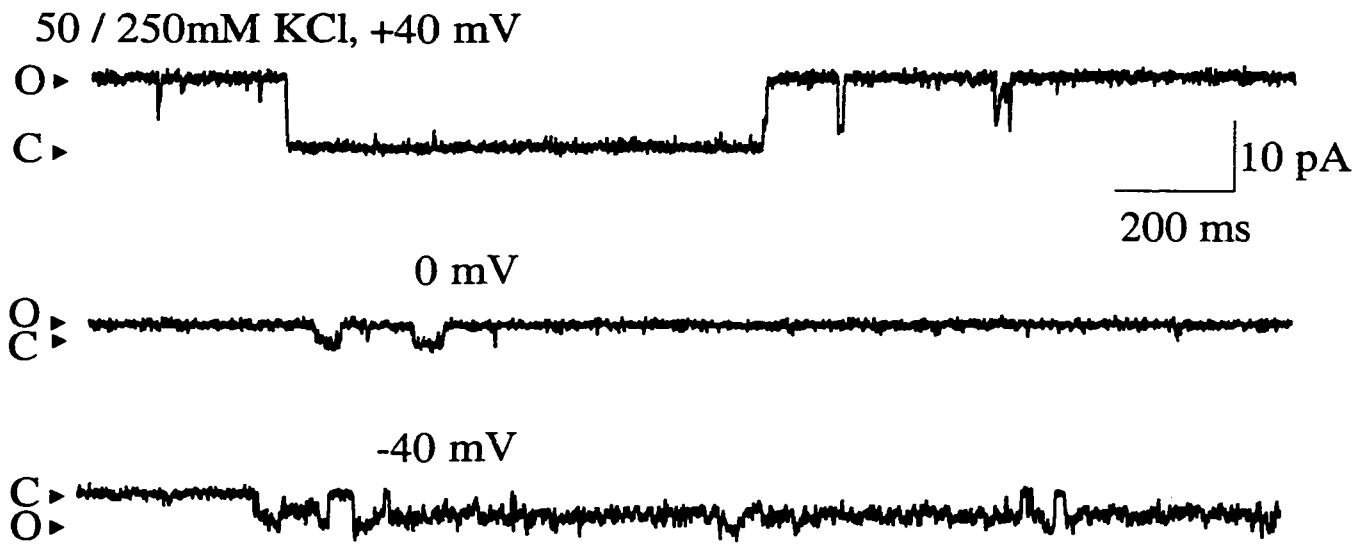
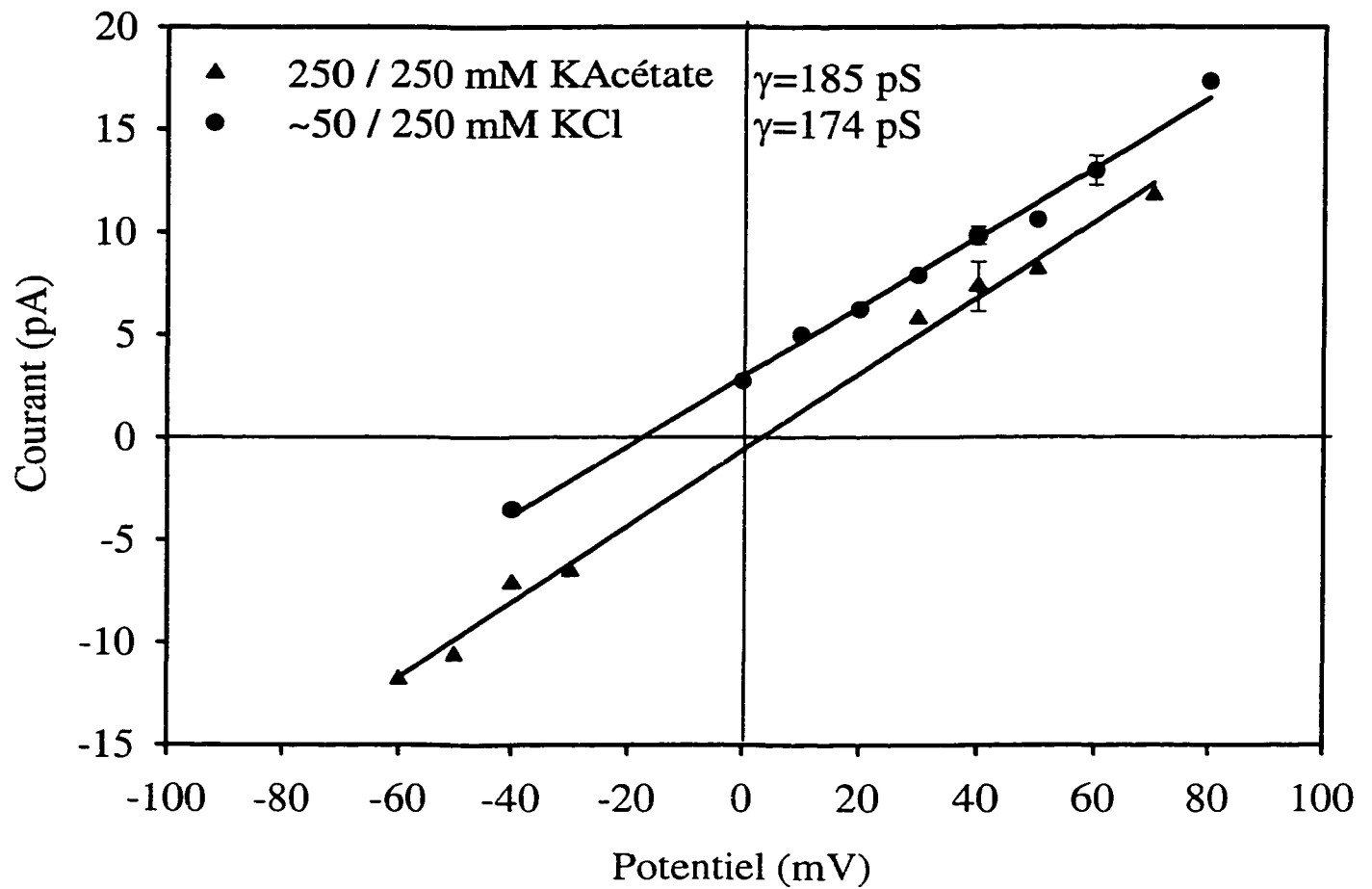
A**B**

Figure 18- Caractéristiques biophysiques du canal K^+ du RS auriculaire ovin.

A) Enregistrements typiques du canal K^+ auriculaire ovin en conditions asymétriques de KCl 50 / 250 mM *trans* / *cis* à des potentiels de maintien de +40 mV, 0 mV et -40 mV.

B) Courbe I-V de canaux K^+ du RS auriculaire ovin en 250 / 250 mM KAcétate et ~50 / 250 KCl montrant des conductances respectives de 185 pS (n=2) et 174 pS (n=2). C ► état

fermé du canal; O ► état ouvert du canal.

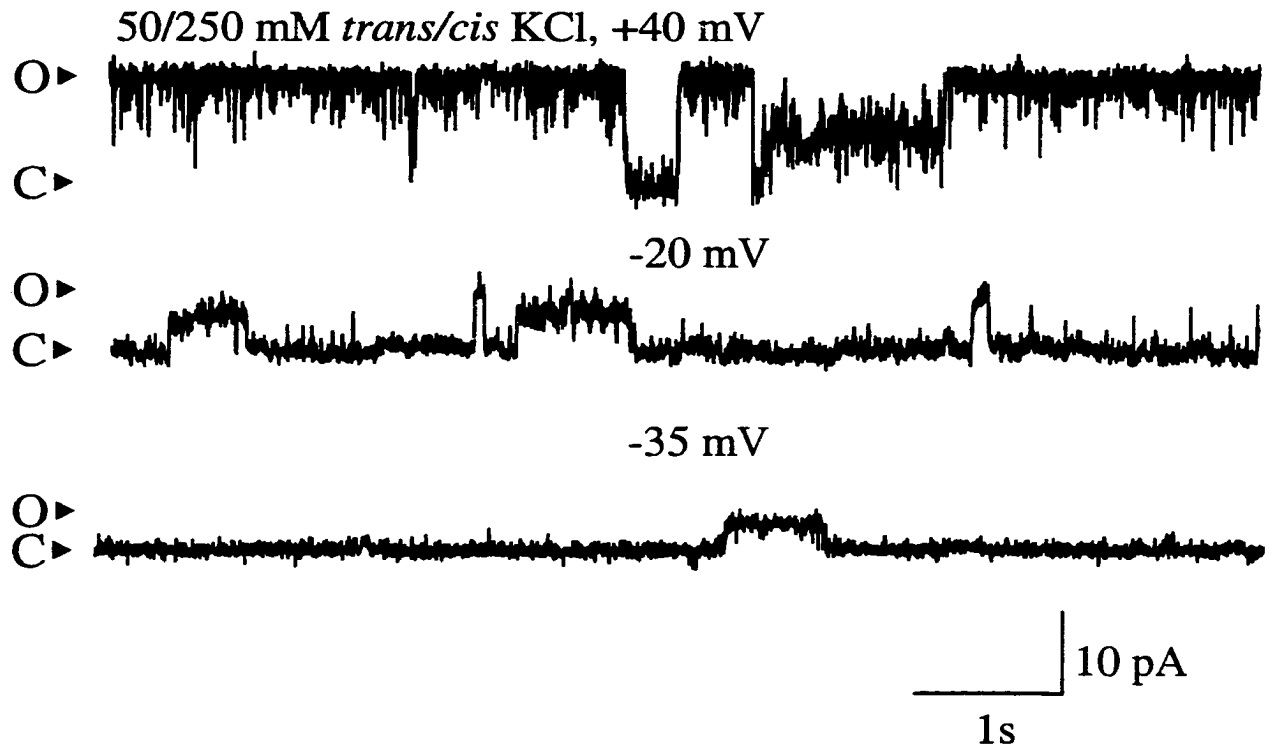
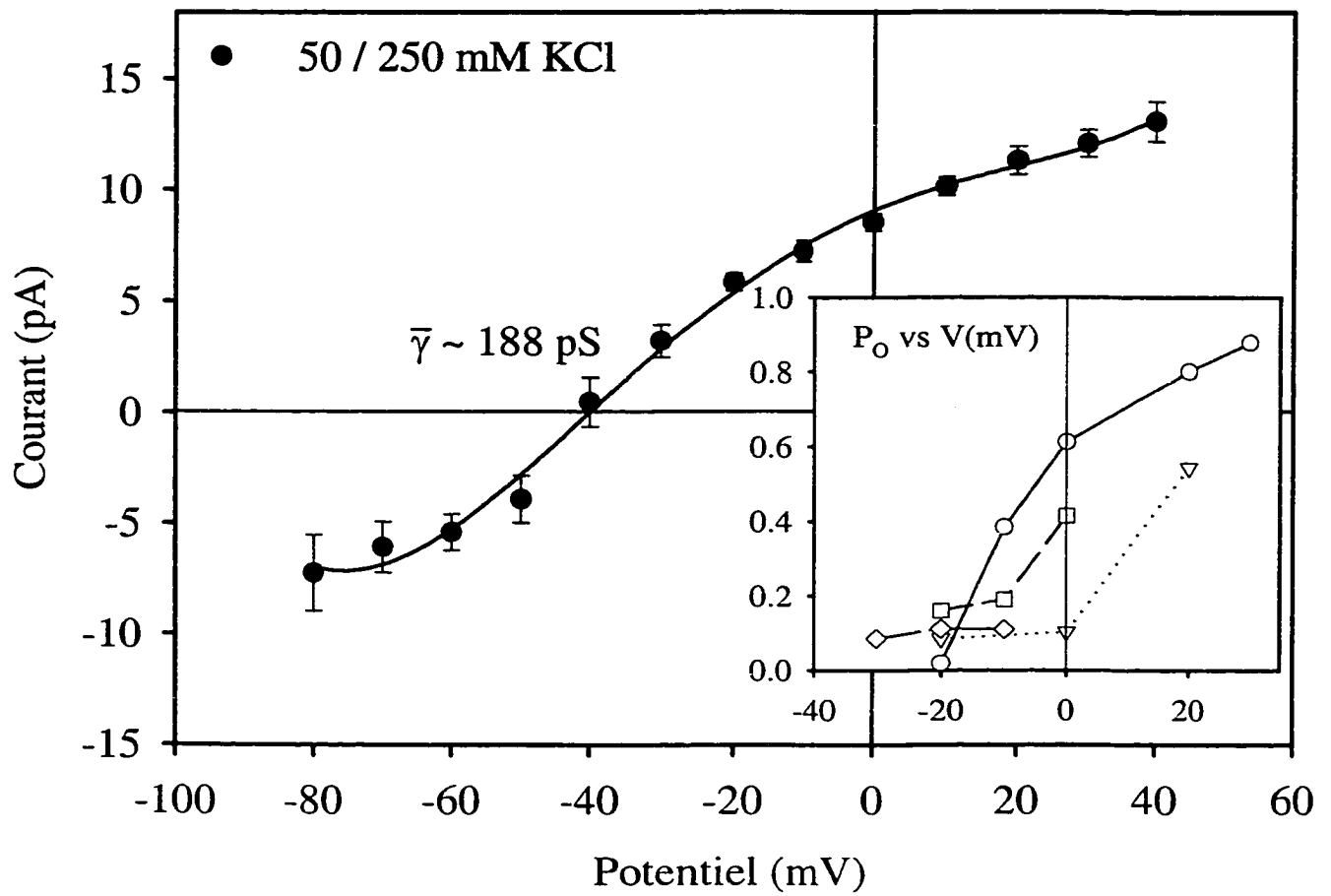
A**B**

Figure 19- Propriétés biophysique et fonctionnelles de canaux K^+ du RS auriculaire humain.

A) Enregistrement de l'activité unitaire de canaux K^+ auriculaires humains pour des potentiels de 40 mV, -20 mV et -35 mV en conditions asymétriques de KCl 50 / 250 mM *trans* / *cis*. B) Courbes I-V de ce type de canaux en conditions asymétriques de KCl 50 / 250 mM *trans* / *cis*. Ces canaux montrent une conductance moyenne de 188 pS (n=37) en conditions asymétriques de KCl 50 / 250 mM *trans* / *cis*. **B, insertion)** Exemple de P_o en fonction du voltage appliqué à la BLP au niveau de trois canaux K^+ du RS auriculaire humain pour une gamme de potentiels allant de -30 mV à +30 mV. C ► état fermé du canal; O ► état ouvert du canal.

type de canal (**B**) ainsi que la dépendance en voltage de la P_O de ces canaux (**B, insert**). Les enregistrements sont représentés à deux potentiels, i.e. 0 mV et -50 mV, en conditions asymétriques de CsCl 50 / 250 mM *trans* / *cis* et, -20 mV et -50 mV, en KCl 50 / 250 mM. Les courbes I-V donnent des valeurs de conductance de 53 pS pour ces canaux en conditions asymétriques de CsCl 50 / 250 mM *trans* / *cis* et de 67 pS en conditions asymétriques de KCl 50 / 250 mM *trans* / *cis*. La P_O (**B, insertion**) ne montre qu'une faible dépendance du voltage dans une gamme de valeurs allant de -70 mV à -20 mV en conditions asymétriques de KCl 50 / 250 mM *trans* / *cis* correspondant bien à ce qui a déjà été rapporté (Decrouy et al., 1995; Decrouy et al., 1996).

Les canaux K^+ du RS ovin et humain

La reconstitution et l'étude des canaux K^+ natifs du RS ventriculaire cardiaque ont préalablement été réalisées par plusieurs groupes (Coronado et al., 1980; Hill, Jr. et al., 1989; Hill, Jr. et al., 1990), incluant le nôtre (Rousseau et al., 1992). Nous avons testé et été en mesure de démontrer la présence de ceux-ci dans nos échantillons de RS auriculaire.

La Figure 18 présente un exemple de canaux K^+ du RS auriculaire ovin. Trois exemples d'enregistrements en conditions asymétriques de KCl 50 / 250 mM *trans* / *cis* pour différents potentiels sont représentés en **A**. Des sous-états ont aussi pu être observés à quelques reprises (**A**) -40mV). En **B**, les courbes I-V en conditions asymétriques de KCl ~50 / 250 mM *trans* / *cis* et symétriques de KAcétate 250 / 250 mM *trans* / *cis* montrent des conductances de 174 pS (n=2) et de 185 pS (n=2), respectivement.

La Figure 19 décrit les canaux K^+ qui furent observés au niveau du RS auriculaire humain. Des enregistrements typiques du comportement de ces canaux reconstitués en

BLP sont représentés en **A** pour différents potentiels en conditions asymétriques de KCl 50 / 250 mM *trans* / *cis*. Ce canal exhibe fréquemment des états sous-conducteurs. La P_o varie en fonction du voltage (ce que l'on peut aussi observer en **B**, **insertion**). La courbe I-V (**B**) semble rectifier quelque peu et montre une conductance moyenne de 188 pS (considérant une dépendance ohmique). L'inversion du courant, en conditions asymétriques de KCl 50 / 250 mM *trans* / *cis*, se situe près de -40 mV (**B**), ce qui est une valeur proche de E_K calculé avec l'équation de Nerst. La dépendance en voltage de la P_o est représentée en **B**, **insertion**. Les trois courbes présentées montrent des dépendances semblables mais déplacées (valeurs de $V_{0.5}$ différentes) pour les trois canaux K^+ du RS auriculaire humain. Ceci pourrait signifier qu'un autre paramètre pourrait intervenir dans la dépendance de la P_o face au potentiel.

Effet de la 4-Aminopyrydine (4-AP)

La Figure 20 montre l'effet de la 4-aminopyrydine (4-AP), un bloqueur de plusieurs canaux potassiques de la membrane de surface. Aucun effet bloqueur notable ne fut observé par l'addition de 5 mM de 4-AP dans la chambre *cis* du montage de BLP, correspondant au côté cytoplasmique de la protéine.

Reconstitution fonctionnelle des canaux Ca^{2+} du RS

Les microvésicules issues du SR des oreillettes humaines démontreraient une liaison spécifique à la ryanodine ce qui suggérerait fortement la présence de canaux Ca^{2+} . L'observation de canaux calciques du RS auriculaire ovin et humain fut possible malgré les difficultés de reconstitution que celui-ci semble amener: fusions plus difficiles qu'avec les vésicules dérivées du RS ventriculaire; BLP plus instables après l'insertion des

protéines. Les canaux RyRs ont été étudiés sous plusieurs conditions ioniques. Il est connu qu'en présence de concentrations inférieures à 100 μM de Ca^{2+} du côté luminal du canal, ce dernier devient meilleur conducteur aux cations monovalents, tels le Na^+ , le K^+ ou le Cs^+ (Lai et al., 1988a), qu'au Ca^{2+} . Les expériences réalisées (Figure 21 et Figure 22) utilisèrent le K^+ comme transporteur de charges au travers des canaux reconstitués.

La Figure 21 montre des canaux calciques du RS auriculaire ovin. Des enregistrements typiques de l'activité de ces canaux sont représentés pour trois potentiels (Figure 21 A). Ces enregistrements ne montrent pas de dépendances évidentes de la P_O au voltage. De plus, il est important de noter que ces enregistrements furent faits en présence de 10 μM de $\text{Ca}^{2+}_{\text{libre}}$ considérant le fait que le canal RyR soit très Ca^{2+} -dépendant de par sa nature et sa fonction. Ces canaux exhibent des valeurs de conductance entre 460 pS et 496 pS en conditions asymétriques de KAcétate 50 / 250 mM *trans* / *cis* et en conditions asymétriques de KCl 50 / 250 mM *trans* / *cis*, respectivement. Les valeurs du potentiel d'inversion près de -30 mV pour ces deux conditions asymétriques attestent de la sélectivité cationique de ces canaux.

La Figure 22 représente les homologues humains des canaux représentés dans la figure précédente. Les enregistrements représentés pour trois potentiels (Figure 22 A), dans les mêmes conditions ioniques que ceux effectués pour la Figure 21 (i.e. 50 / 250 mM KCl *trans* / *cis*), montrent une amplitude plus grande pour les canaux RyRs humains que ceux ovins. De plus, la cinétique de ces derniers semble quelque peu différente de celle des canaux RyRs de mouton. Les conductances ioniques calculées à partir des courbes I-V (B) appuient les observations qualitatives faites en A. Des conductances de 671 pS en conditions asymétriques de KCl 50 / 250 mM *trans* / *cis* et 400 pS en conditions symétriques de CsCl 250 / 250 *trans* / *cis* furent observées.

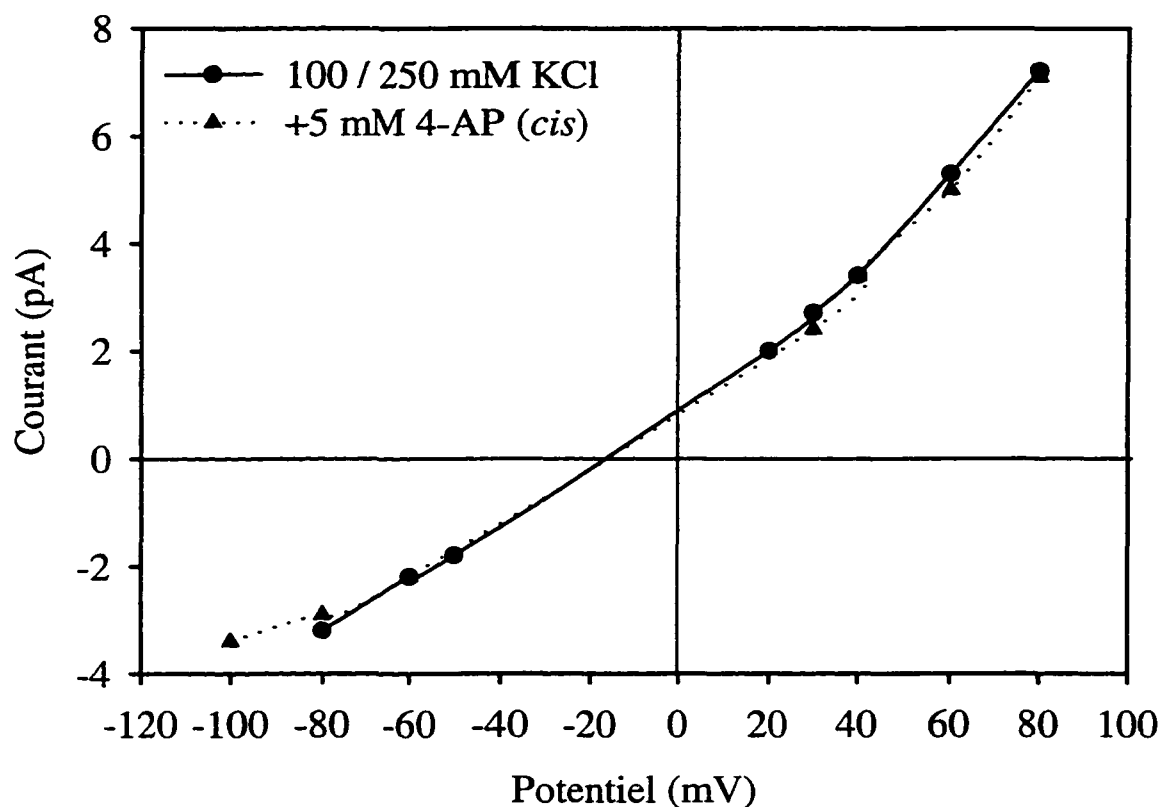


Figure 20- Effet de la 4-AP sur l'amplitude d'un canal K^+ du RS auriculaire humain.

La 4-AP est un bloqueur des canaux K^+ de surface activés par le voltage. L'addition de 5 mM de 4-AP du côté *cis*, étudiée en conditions asymétriques de KCl 100 / 250 mM *trans* / *cis*, ne semble pas causer de blocage du canal. En effet, la courbe I-V démontre l'absence d'effet de la 4-AP sur un canal K^+ du RS auriculaire humain.

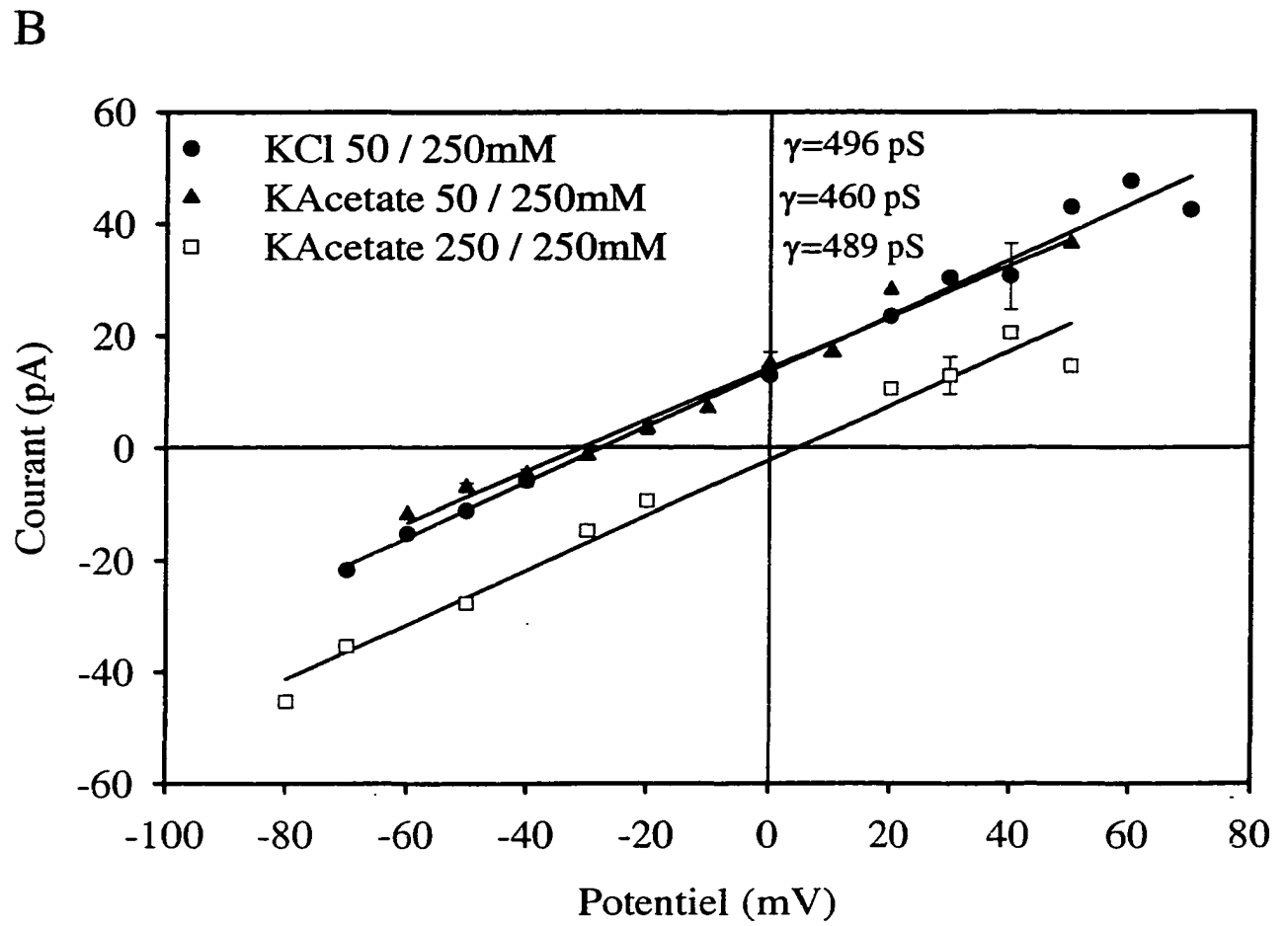
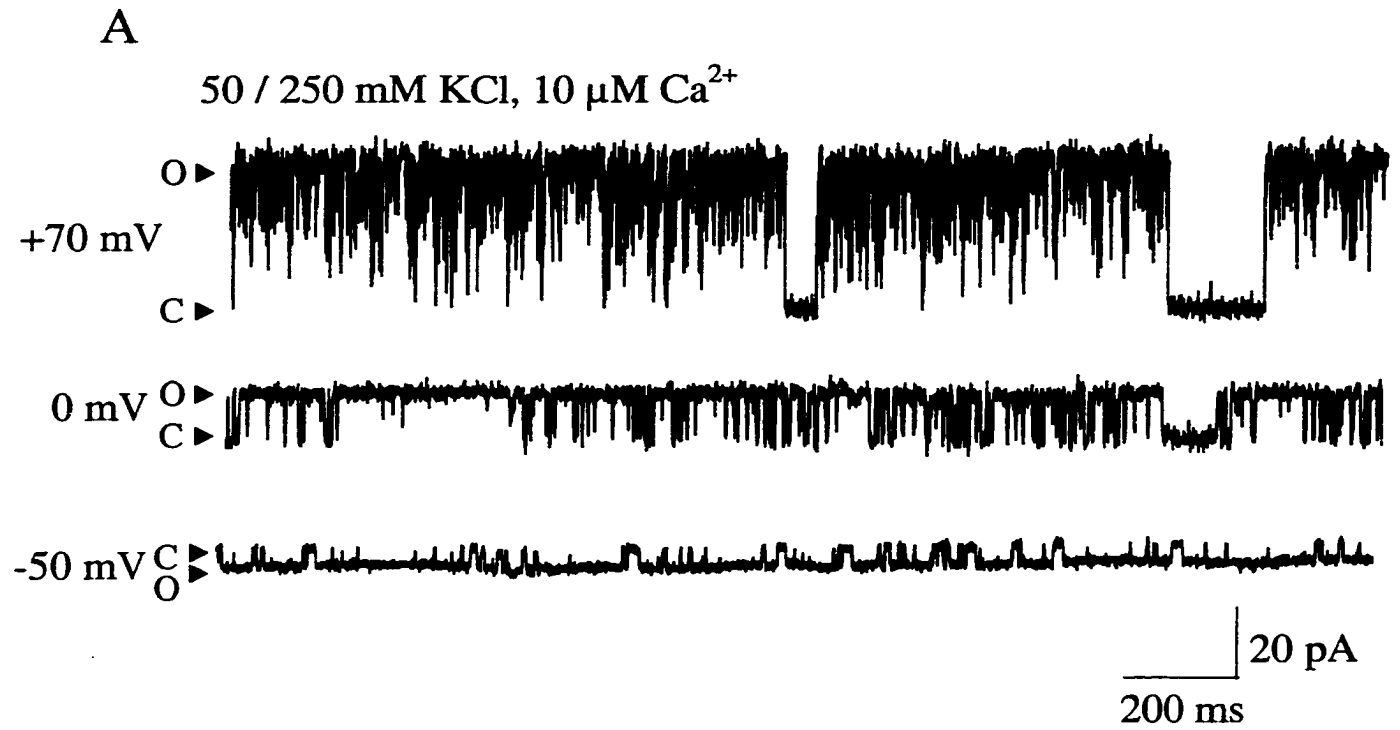


Figure 21- Comportement du canal Ca^{2+} du RS auriculaire ovin.

A) Enregistrements typiques d'un canal Ca^{2+} du RS auriculaire ovin à des potentiels de +70 mV, 0mV et -50 mV en conditions asymétriques de KCl 50 / 250 mM *trans* / *cis*. **B)** Courbes I-V de ce type de canal montrant des conductances respectives de 496 pS (n=3) en conditions asymétriques de KCl 50 / 250 mM *trans* / *cis*, 460 pS (n=3) en conditions asymétriques de KAcétate 50 / 250 mM *trans* / *cis* et 489 pS (n=2) en conditions symétriques 250 / 250 mM KAcétate *trans* / *cis*. Le canal montre un comportement ohmique et une cinétique d'ouverture-fermeture "flickering" influencée par le voltage. **C** ► état fermé du canal; **O** ► état ouvert du canal.

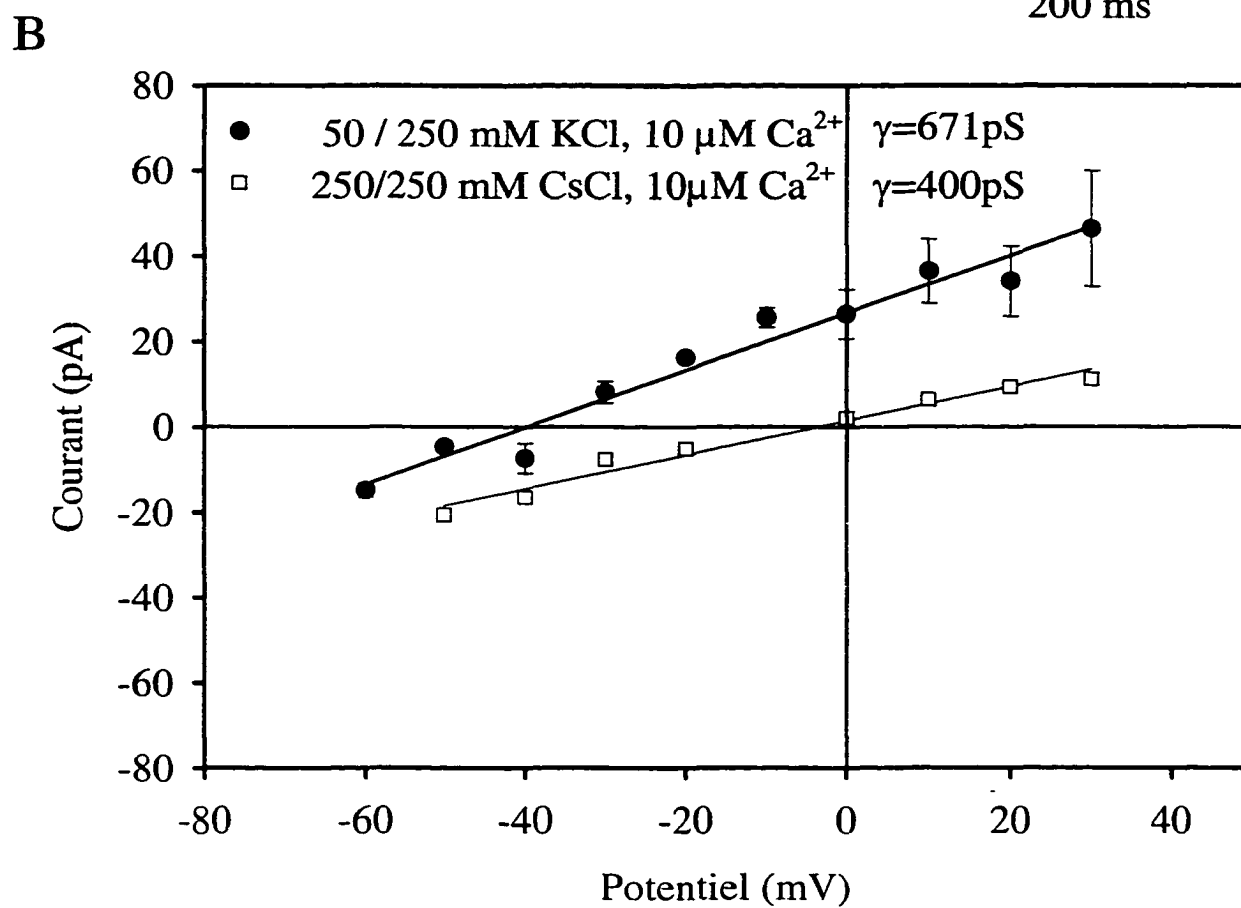
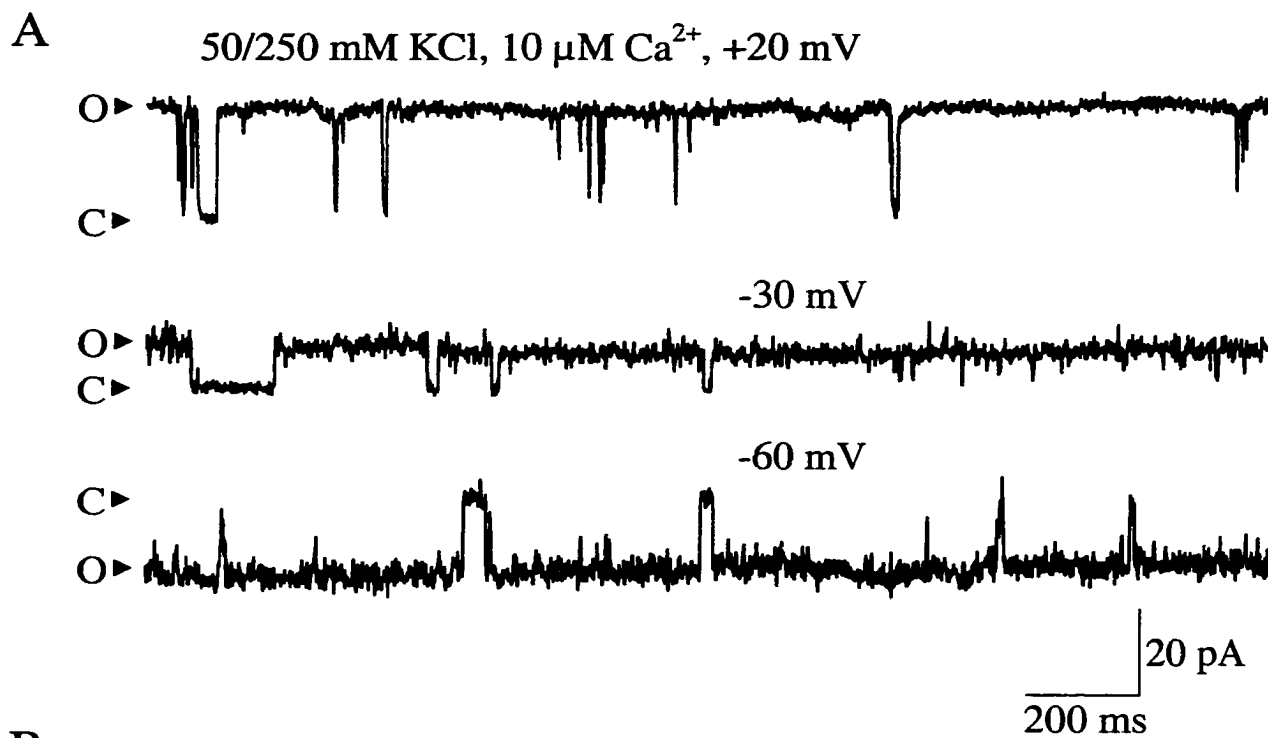
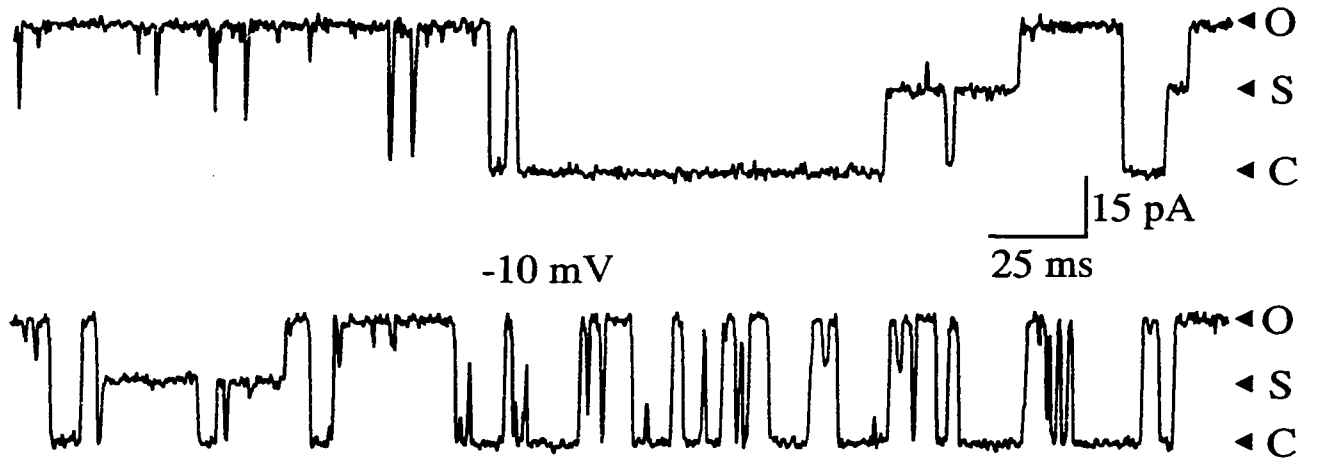


Figure 22- Caractérisation du canal Ca^{2+} du RS auriculaire humain.

A) Enregistrements typiques de canaux Ca^{2+} du RS auriculaire humain à +20 mV -30 mV et -60 mV en conditions asymétriques 50 / 250 KCl *trans* / *cis*. **B)** Courbes I-V de ce type de canal montrant une conductance de 671 pS (n=10) en conditions asymétriques de KCl 50 / 250 mM *trans* / *cis* et de 400 pS (n=1) en conditions symétriques de CsCl 250 / 250 mM *trans* / *cis*. **C** ► état fermé du canal; **O** ► état ouvert du canal.

A

50 / 250 mM *trans* / *cis* KCl, 0 mV

B

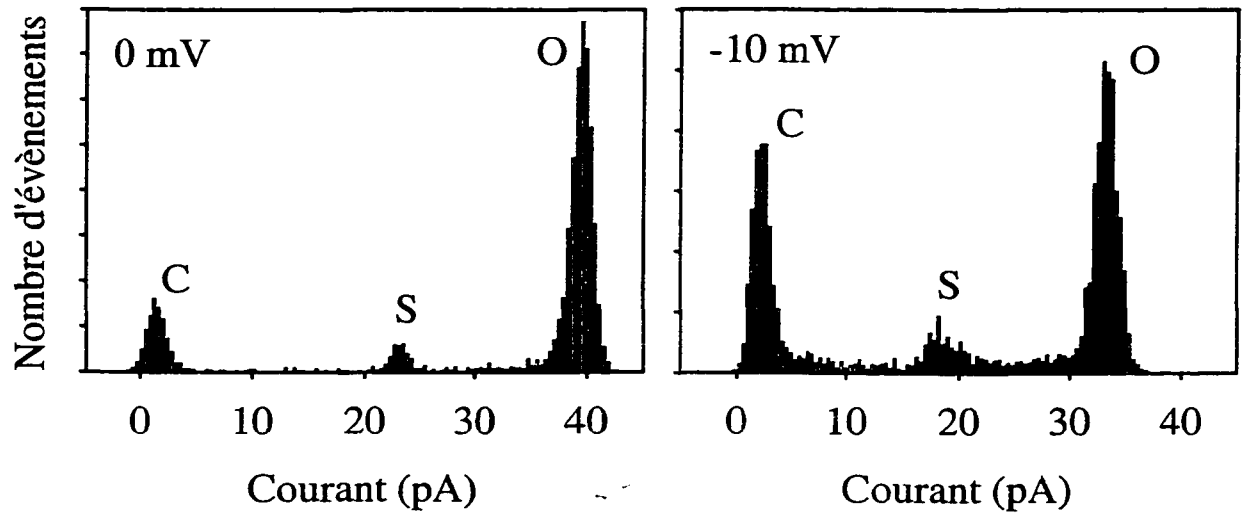


Figure 23- Détermination et analyse des sous-états des canaux RyRs du RS auriculaire humain.

A) Enregistrement sur une échelle de temps éclatée montrant la cinétique et l'amplitude du principal sous-états (50 %) du canal RyR auriculaire humain en conditions asymétriques de KCl 50 / 250 mM trans / cis pour des potentiels de 0 mV et -10 mV. **B)** Histogrammes d'amplitudes correspondant aux enregistrements de **A**, montrant aussi un sous-état à 50 % de l'amplitude maximale de la conductance du canal RyR. Des sous-états de très courtes durées, quoique mal résolus du fait de la fréquence de coupure à 1kHz, à $\sim 1/4$ et $3/4$ de l'amplitude maximale ont aussi été observés. O ► État ouvert ; C ► état fermé ; S ► état sous-conducteur.

A 50 / 250 mM CsCl *cis/trans* + 2mM CaCl₂, +40 mV



B + 2 mM Na-ATP



Figure 24- Activation par l'ATP d'un canal Ca^{2+} du RS auriculaire humain.

A) Enregistrement unitaire (contrôle) d'un canal Ca^{2+} du RS auriculaire humain présentant la cinétique du canal en conditions asymétriques de CsCl 50 / 250 mM *trans* / *cis* + 2 mM CaCl_2 à un potentiel de +40 mV. Le transporteur de charge est le Cs^+ . **B)** Enregistrement subséquent de ce canal, dans les mêmes conditions, suite à l'addition de 2 mM d'ATP-Na en *cis*. Noter le courant capacitif en début de trace représentant la réponse de la bicouche au saut de voltage de 0 mV à +40 mV (courant capacitif).

Les enregistrements de canaux RyRs montrent la présence de sous-états. Les enregistrements (A) et les histogrammes (B) de la Figure 23 montrent bien le sous-état principal (à 50 ± 5 % de l'amplitude maximale) en conditions asymétriques de KCl 50 / 250 mM *trans* / *cis*. Ces états sont de très courtes durées mais très bien définis. Des états sous-conducteurs moins bien définis à $\frac{1}{4}$ et à $\frac{3}{4}$ de l'amplitude maximale du courant sont également observés sporadiquement, ce qui pourrait traduire un défaut de coopérativité entre les sous-unité des tétramères (Liu et al., 1989; Rousseau et Chabot, 1992).

L'ATP et certaines molécules dérivées (cADP-ribose, AMP-PCP, cAMP etc.) sont connues pour se lier aux RyRs cardiaques et activer ceux-ci à des concentrations sub mM (Meissner et al., 1986; Rousseau et al., 1986). La Figure 24 montre l'activation d'un canal Ca^{2+} du RS auriculaire humain par 2 mM d'ATP en conditions asymétriques de CsCl 50 / 250 mM *trans* / *cis* + 2 mM CaCl_2 . Les canaux RyRs auriculaires ovins sont également activables par l'ajout de 2 mM d'ATP (non-illustré). Les caractéristiques biophysiques que les canaux RyRs auriculaires humains et ovins exhibent sont similaires, sinon identiques, à celles connues pour les RyRs de myocytes ventriculaires d'autres espèces (Anderson et al., 1989).

Identité de l'isoforme auriculaire du RyR

Des anticorps monoclonaux (anti-RyR2) et polyclonaux (anti-RyR1 et anti-RyR3) ont été utilisés dans le cadre d'expériences d'immunobuvardage "western blot" afin de déterminer les isoformes de RyRs présentes au niveau de différents types de cellules musculaires cardiaques (oreillettes/ventricules) chez différentes espèces étudiées (humaines, ovines, canines).

La Figure 25 montre des immunobuvardages, suite à une séparation des protéines du RS sur SDS-PAGE (6%), avec des anticorps contre les: RyR1 (A), RyR2 (B) et RyR3 (C). Les puits des trois immunobuvardages contiennent: un standard protéique de haute masse moléculaire (Kaleidoscope Prestained Standards), nous permettant d'attribuer un poids moléculaire relatif aux différentes bandes obtenues, des membranes de RS issues de muscles cardiaques (humains, ovins ou canins) et / ou du diaphragme (canin ou de lapin) et / ou de muscles squelettiques à contractions rapides, muscles blancs de lapin. Les immunobuvardages utilisant les anticorps contre le RyR1 (A) n'ont démontré aucune réactivité avec les protéines des tissus cardiaques ; par contre l'échantillon de muscle squelettique de lapin (utilisé comme contrôle positif) montre une immunoréactivité avec une bande de très haut poids moléculaire. De façon similaire, les immunobuvardages contre les anticorps de RyR3 (C) ne montrèrent pas de réactivité avec les échantillons dérivés de tissus cardiaques, mais en montrèrent avec leur contrôle positif (i.e. les échantillons de diaphragme de chien). Il existe aussi une réaction non-spécifique avec une protéine de 200 kDa du RS auriculaire humain et dans l'échantillon "standard" au niveau de la myosine. Cependant, le marquage des RyR2 (B) révèle des bandes de hauts poids moléculaires au niveau de tous les tissus cardiaques étudiés (auriculaires et ventriculaire). Il est à noter que la bande de réactivité de haut poids moléculaire au niveau du tissu auriculaire ovin est beaucoup moins marquée qu'au niveau des autres tissus cardiaques, mais est néanmoins présente. La raison de cette différence ne fut cependant pas éclaircie. De plus, des bandes de faibles poids moléculaires, très probablement dues à des fragments protéolytiques de RyRs, ont aussi été détectées avec l'anticorps contre le RyR de type 2 dans les échantillons de RS humain et canin.

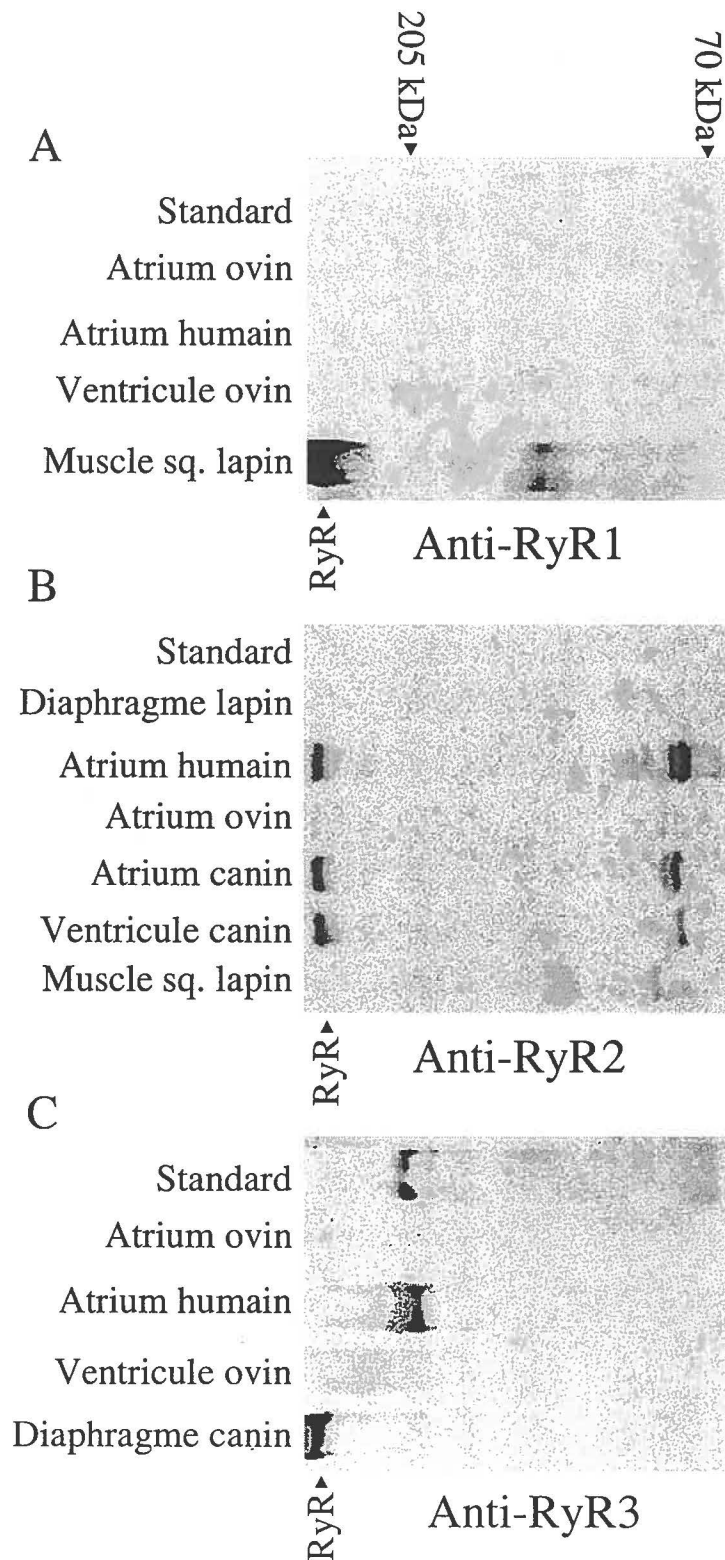


Figure 25- Immunobuvardages "Western blot" réalisés en utilisant des anticorps spécifiques contre les trois isoformes de RyR.

A) Immunobuvardage utilisant des anticorps spécifiques contre le RyR1 sur des échantillons de RS auriculaire ovin et humain, ventriculaire ovin et de muscle squelettique de lapin (contrôle positif du RyR1). **B)** Immunobuvardage utilisant des anticorps spécifiques contre le RyR2 sur des échantillons de RS auriculaire humain, ovin et canin, ventriculaire canin (contrôle positif), de muscle squelettique de lapin (contrôle négatif) et de diaphragme de lapin. **C)** Immunobuvardage utilisant des anticorps spécifiques contre le RyR3 sur des échantillons de RS auriculaire humain et ovin, ventriculaire ovin et de diaphragme canin. Le standard a été le même pour **A**, **B** et **C** (Kaleidoscope Prestained Standards). RyR►: bande du RyR.

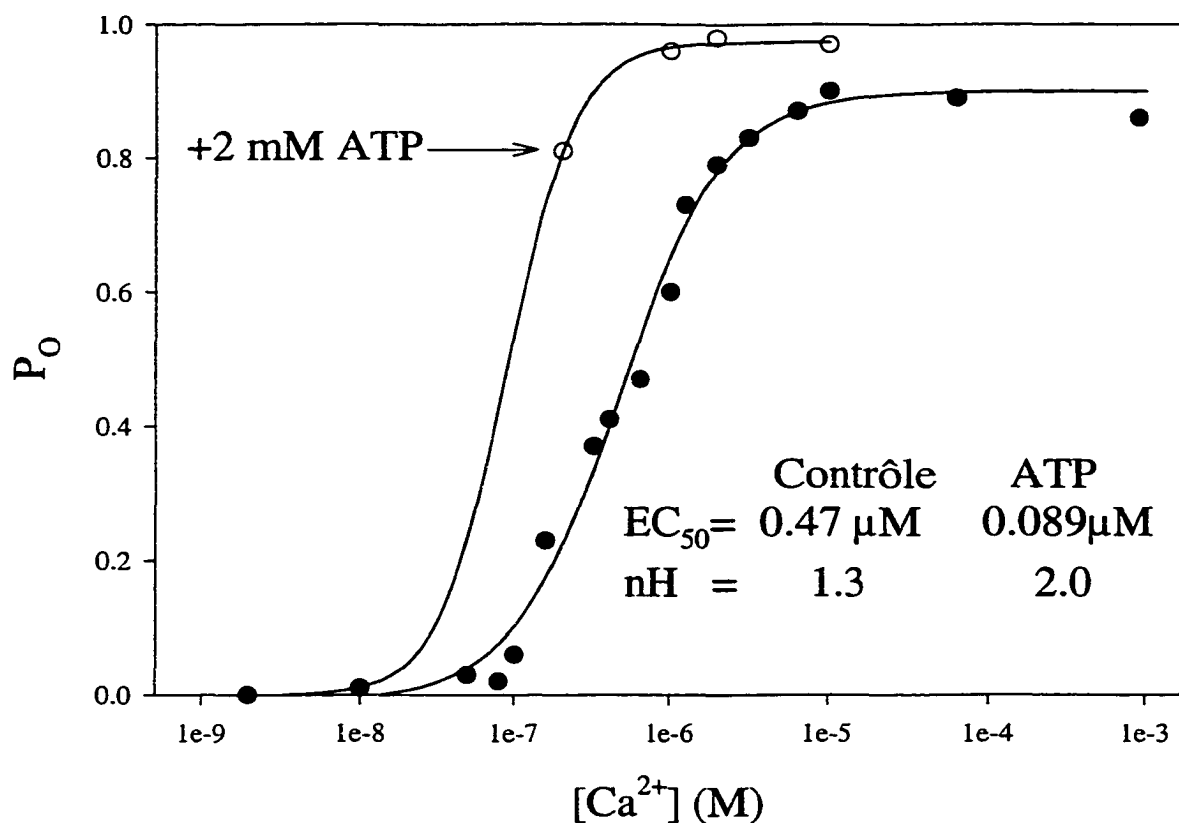


Figure 26- Courbe d'activation par le Ca^{2+} et l'ATP de canaux RyRs ventriculaires canins.

Courbes de P_O en fonction du $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{libre}}$ avec (○) et sans 2mM d'ATP(●), montrant l'activation des canaux; EC_{50} de $0.47 \mu\text{M}$ et $0.089 \mu\text{M}$, respectivement. Les différents paramètres sont calculés à l'aide d'une équation de Hill. Adapté de (Rousseau et Meissner, 1989).

Ces résultats démontrent donc que l'anti-RyR2 reconnaît une bande de haut poids moléculaire au niveau des oreillettes humaines similaire à celle observée dans les autres tissus cardiaques de mammifères. Cependant, aucune immunoréactivité avec des bandes de poids moléculaire correspondant aux RyRs ne fut détectée dans les échantillons cardiaques à l'aide des anticorps contre les RyRs de types 1 et 3.

Discussion

La présence et la fonctionnalité du RS au niveau auriculaire fut l'objet de débats dans la littérature. Initialement, le RS a été considéré quasi-inexistant dans cette région du cœur (Figure 11 et 2). Notre étude vient donc suppléer et compléter les études précédentes sur les différentes protéines du RS au niveau auriculaire, i.e.: canaux Cl^- /phospholamban (Decrouy et al., 1995), junctine, triadine et Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPases (Luss et al., 1999). Cependant, ce type d'étude du canal calcique, l'une des plus importantes protéines décrivant la fonctionnalité du RS, a été, à notre connaissance, entreprise pour la première fois au niveau auriculaire humain par notre équipe.

Microscopie électronique

Une étude préliminaire en microscopie électronique fut entreprise afin de mieux caractériser la qualité des échantillons de tissus auriculaires humains recueillis lors des chirurgies et utilisés lors de nos expériences. Il est intéressant de noter que l'oreillette contient les structures normales (Figure 11 et 12) constituant tout myocyte cardiaque (myofilaments, stries Z, disques intercalaires, grains de glycogène, etc.) correspondant aux observations faites précédemment (Sommer et Waugh, 1976). De surcroît, les mitochondries, qui sont très sensibles à la dégradation, possèdent encore des structures intactes. Ceci nous assure de la qualité de nos préparations et de notre méthode de préservation et de transport des tissus vers le laboratoire dans les minutes qui suivent le prélèvement en salle d'opération par la chirurgie.

Il faut noter que dans plusieurs tissus auriculaires, les tubules T sont quasi-inexistants ce qui explique peut-être que le RS soit difficile à localiser à ce niveau (Bossen

et al., 1981). Il serait possible, ultérieurement, de marquer spécifiquement ce RS à l'aide d'une coloration spécifique du RS, en adaptant l'une des techniques décrites par (Sommer et Waugh, 1976).

Expérience de liaison spécifique à la [^3H]-ryanodine

Connaissant la capacité du RS à lier spécifiquement la ryanodine (propriété lui conférant son pseudonyme de RyR), des études de liaisons spécifiques à cette molécule ont été entreprises. Elles ont permis de déterminer qu'une densité inférieure de RyRs (Tableau 7) est présente au niveau des tissus auriculaire humain et ovin qu'au niveau des tissus ventriculaires canins (i.e. 4.5 fois moins). Cette valeur de liaisons spécifiques inférieure au niveau atrial qu'au niveau ventriculaire correspond à une plus faible densité de RyRs sur les tissus auriculaires que ventriculaires annonçant un niveau de couplage via le CICR moins développé, mais bien présent chez les tissus auriculaires.

Cependant, tous ces tissus ont des K_d pour la ryanodine et EC_{50} pour le Ca^{2+} qui sont semblables. Par ailleurs, le B_{\max} dérivé des expériences de liaison spécifique à la [^3H]-ryanodine est 4.5 fois inférieure au niveau des tissus auriculaires que par rapport à ceux ventriculaires. Ces observations laissent supposer que d'une façon générale la densité de RyRs est inférieure au niveau des oreillettes mais que la fonctionnalité de ces canaux pourrait être similaire vu la ressemblance de leurs paramètres biochimiques. Cependant, il est à noter que nos échantillons humains proviennent des appendices auriculaires droites de patients, souvent âgés (>55 ans), subissant une opération cardiaque et souvent atteint d'hypertension. Les appendices auriculaires recueillis n'étaient cependant en aucun cas des tissus ischémiques, infarciés ou nécrosés. Or, certaines recherches tendent à prouver qu'une localisation privilégiée des protéines impliquées au

niveau du couplage E-C, des récepteurs à la ryanodine par exemple, se produit au travers même du muscle cardiaque ou d'une région de celui-ci (Hittinger et al., 1999). *Hittinger et al.* a démontré un gradient subendocardiale / subépicardiale du nombre de RyRs chez des cœurs de chiens. Ils ont aussi montré que lors de l'hypertrophie cardiaque, il y avait ségrégation dans la baisse d'expression en fonction de la localisation intra-tissulaire dans la paroi myocardique. D'autres études ont rapportées que l'hypertrophie cardiaque induit des variations au niveau de l'expression des différentes protéines régulatrices (Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPase, PLB, CSQ, RyR) de la contraction du cœur (Hashida et al., 1999). Il pourrait donc avoir une influence de l'âge des patients et/ou de la condition hypertrophique de leur cœur dans les études qu'ont été menées. Les patients desquels les appendices ont été récupérés étaient essentiellement des patients affligés de maladies coronariennes ou de cardiomyopathies valvulaires

Il est aussi à considérer que l'appendice auriculaire consiste en une région localisée des oreillettes qui pourrait présenter des différences par rapport au reste du tissu auriculaire. Quant à nos échantillons auriculaires ovins, ils sont formés d'un homogénat des oreillettes entières. Ceci est donc à considérer lors de l'analyse des différents résultats obtenus. Il se pourrait que l'échantillon auriculaire recueilli au niveau de l'appendice ne soit pas représentatif du reste de l'oreillette.

D'autre part, une étude qualitative et quantitative comparant le RS de l'oreillette gauche, de l'oreillette droite et du ventricule gauche (Bossen et al., 1981) suggère que le RS auriculaire jonctionnel soit de 3 à 4 fois moins développé que celui du ventricule gauche. En assumant que la densité de RyRs au niveau du RS jonctionnel est semblable au niveau ventriculaire et auriculaire, ces résultats seraient consistants avec les nôtres, montrant la présence de 4 à 5 fois moins de RyRs au niveau auriculaire qu'au niveau

ventriculaire (Tableau 7). Si nous assumons que les tissus auriculaires contiennent une grande quantité de SR libre "FSR", les RyRs devraient être localisés majoritairement sur le SR jonctionnel, éventuellement en apposition à la membrane sarcolemmale, et quasi-absent sur le "FSR".

Mis à part le B_{\max} , la similarité des résultats biochimiques (EC_{50} pour le Ca^{2+} , le nH et l' IC_{50} pour la ryanodine et nH) entre les oreillettes humaines et ovines et avec ceux du ventricule canin, suggère une forte similarité entre les RyRs des oreillettes et des ventricules de ces trois espèces. Des résultats issus d'autres équipes appuient ces observations (Anderson et al., 1989; Pessah et Zimanyi, 1991). De plus la valeur d' EC_{50} obtenue en liaison spécifique avec la [3H]-ryanodine (Figure 15) est pratiquement identique à celle déterminée à partir de l'activation de la P_O par le Ca^{2+} au niveau des tissus ventriculaires (Figure 26). Ceci laisse donc présager de la similarité fonctionnelle des deux mécanismes, que ce soit sur des tissus auriculaires ou ventriculaires.

Les coefficients de Hill (nH) proches de 1 qui furent obtenus pour la [Ca^{2+}] suite aux mesures de liaison spécifique à la [3H]-ryanodine pour des concentrations croissantes de [Ca^{2+}]_{libre} suggèrent un mécanisme de coopérativité limité entre les différentes sous-unités de RyR. Ces résultats sont très semblables à l'activation de la P_O par le Ca^{2+} qui fut décrit sur des tissus ventriculaires (Figure 26); ceux-ci possédant un coefficient de Hill aussi très près de 1. Cependant, il est à noter que la coopérativité pourrait augmenter lors de l'addition de certains agents comme l'ATP (Figure 26). En effet, l'addition d'ATP augmente de beaucoup le facteur de Hill apparent, ce qui signifierait une potentialisation, par ce type d'agents, de la coopérativité entre les sous-unités du tétramère qui forme les RyRs. Cela fut aussi rapporté et défendu par une autre équipe (Xu et al., 1996).

D'autres part, le haut niveau de liaison non-spécifique observé (Figure 13 et Figure 14) dans les différents tissus étudiés (i.e. auriculaires ovins > auriculaires humains > ventriculaires canins) suggère que les oreillettes ovines possèdent un fort pourcentage de gras.

L'étude comparative avec des tissus ventriculaires humains se serait avérée fort intéressante. Cependant, il aurait été techniquement et éthiquement difficile d'étudier ces tissus. Notre étude requérant des tissus vivants, seule la récupération du cœur de patients transplantés aurait permis une telle approche complémentaire sur des tissus ventriculaires humains. Malheureusement, aucune transplantation cardiaque ne s'effectue dans notre institution.

Canaux Cl^- du RS

Les canaux Cl^- du RS auriculaire humain et ovin ont été reconstitués dans les BLP. Ces canaux montrent une bonne sélectivité au Cl^- , car son potentiel d'inversion en conditions asymétriques (50 / 250 mM KCl) est très près de celui prédit par l'équation de Nerst pour l'ion Cl^- (Annexe A). Les caractéristiques de ces canaux sont typiques de celles qui ont été observées et publiées précédemment par notre laboratoire (Decrouy et al., 1996) au niveau de canaux Cl^- issus du RS auriculaire humain: une conductance de 67 ± 2 pS (50 / 250 mM CsCl) mesurée est très comparable à la valeur que nous avons obtenu i.e. 61 ± 4 pS (50 / 250 mM KCl). De plus, la cinétique de leurs canaux est similaire à celle de nos canaux et leurs P_O très peu voltage-dépendante tout comme pour les canaux que nous avons étudiés. Cependant, nous n'avons pas observé d'inactivation de ces canaux avec le temps comme ce fut le cas pour une certaine population des canaux enregistrés par cette équipe (Decrouy et al., 1996).

Un tel type de canal anionique de très grandes conductances est typique du RS. En effet, les canaux typiques que l'on retrouve au niveau du sarcolemme de l'oreillette: $I_{CFTR,cardiac}$, $I_{Cl,Ca}$ et $I_{Cl,swell}$ possèdent de très faibles conductances, sauf $I_{Cl,swell}$, qui possèdent une conductance de l'ordre de 50 pS (Sorota, 1999). Ce dernier peut par contre être négligé car notre système de BLP utilise des protéines reconstituées empêchant l'enregistrement de variation d'activité puisque le cytosquelette est détruit. Les conductances Cl^- très élevées qui ont été observées ne pouvant provenir de canaux Cl^- du sarcolemme, le seul canal chlore des cellules auriculaires pouvant posséder une telle conductance provient du RS.

Canaux K^+ du RS

Des canaux cationiques, de très grandes conductances, sélectifs au K^+ furent aussi observés (188 pS). Ces canaux, tout comme les canaux Cl^- mentionnés ci-haut, sont indicateurs de la présence de membranes provenant du RS. Les canaux K^+ cardiaques de la membrane de surface possèdent des conductances beaucoup plus petites, ne pouvant être confondues avec les canaux K^+ provenant du RS.

Les canaux K^+ du RS auriculaire humain qui furent observés (Figure 19) sont similaires à ceux déjà observés au niveau du RS de différents tissus: cardiaques (Hill, Jr. et al., 1989; Hill, Jr. et al., 1990; Shen et al., 1993), squelettiques (Coronado et al., 1980; Ide et al., 1991) ou de diaphragme (Picher et al., 1996) chez d'autres espèces. Tous ces canaux possèdent des propriétés semblables à celles qui ont été observées lors de la présente étude. Une conductance similaire à celle obtenue (~180 pS) est prévue, dans les conditions ioniques utilisées dans nos expériences, par l'équipe de Coronado sur des canaux K^+ du RS de tissus squelettiques de lapin (Coronado et al., 1980). Des

conductances du même ordre de grandeur ont été mesurées sur des canaux similaires issus de tissus ventriculaires canins (Hill, Jr. et al., 1990; Shen et al., 1993). Ces mêmes études démontrent la présence d'un sous-état situé à ~50% de la conductance maximale, sous-état qu'il nous fut aussi possible d'observer (Figure 19). Cependant, à ce jour, tous les résultats d'expériences rapportées sur les canaux K^+ sont dérivés de tissus ventriculaires. Nos résultats révèlent une très grande similitude entre les deux types de tissus cardiaques, ce qui atteste des ressemblances structurales et fonctionnelles entre les canaux K^+ du RS des deux types de tissus cardiaques.

Par ailleurs, l'amplitude du sous-états d'un canal K^+ du RS de muscle squelettique serait dépendante de la charge des têtes de phospholipides du microenvironnement lipidique entourant ces canaux (Anzai et al., 1994). Le rapport de phospholipides chargés négativement (PS), que nous avons utilisé lors des expériences de reconstitution en bicouches lipidiques planes, a été de 1/3 et l'amplitude du sous-état observé de ~50% de la valeur de l'état complètement conducteur. Le rapport de la conductance de l'état sous conducteur comparativement à l'état complètement ouvert qui était prévu par *Anzai et al.* pour une telle quantité de PS était entre ~50% et ~57% ce qui correspond bien à nos résultats.

De plus, les canaux K^+ du RS auriculaire humain, montrent un potentiel de zéro-courant qui attestent de leur sélectivité au K^+ (proche du potentiel d'équilibre calculé à l'aide de l'équation de Nerst). Ils possèdent aussi une dépendance au voltage de type Boltzmann où la $V_{0.5}$ varie entre -20 mV et +20 mV. La cause de cette variation est cependant encore mal comprise. Certaines études (Chabot, 1993) montreraient que l'environnement lipidique entourant le canal pourrait être une des causes de ce changement, cependant, ces études écartent le rôle de la charge effective du senseur de

potentiel transmembranaire du canal K^+ du RS (Z_S). D'après les résultats recueillis par *Chabot* (Chabot, 1993), ce paramètre (Z_S) resterait inchangé malgré les variations de la plage d'activation de la P_O vis-à-vis le potentiel. Cependant, son étude indique une variation de l'énergie de Gibbs (ΔG_i) des canaux K^+ (énergie conformationnelle entre l'état ouvert et l'état fermé d'un canal en absence de différence de potentiel à son interface), un paramètre reflétant les interactions avec l'environnement biochimique du canal en question. En conséquence, l'hypothèse probable serait une interaction des différents canaux K^+ du RS avec leur microenvironnement lipidique engendrant une différence dans leur cinétique d'ouverture-fermeture à un potentiel donné.

La 4-AP, qui est utilisée comme inhibiteur de canaux K^+ de la membrane de surface a été testé et n'a montré aucun effet sur les canaux K^+ du RS auriculaire humain (Figure 20). Ces résultats contredisent ce qui fut publié par *Liu et al.* quant au blocage de canaux K^+ du RS cardiaque canin (Liu et al., 1998). Il faut mentionner que l'effet bloqueur de la 4-AP observé sur les canaux K^+ du RS cardiaque canin par cette équipe a nécessité des concentrations de près de 20 mM de 4-AP. Dans notre étude, nous nous sommes limité à un maximum de 5 mM, concentration que nous avons considérée comme une limite maximum à l'obtention d'effets spécifiques à l'action de la drogue. La modulation observée ne pourrait être qu'un artéfact et aucun effet de blocage réel ne surviendrait donc en présence de 4-AP.

La présence dans nos préparations microsomales de canaux Cl^- similaires à ceux du RS ventriculaire ainsi que les canaux K^+ alliés à la présence de liaison spécifique à la ryanodine démontrent que nos préparations contiennent bel et bien un RS fonctionnel.

Les canaux K^+ , ainsi que les canaux Cl^- du RS seraient très importants quant au maintien d'une force électrochimique pour les ions Ca^{2+} à l'interface de la membrane du RS. Ce sont eux qui permettraient au potentiel de la membrane de se maintenir en tout temps éloigné du potentiel d'équilibre du Ca^{2+} . Cela permettrait la libération rapide du Ca^{2+} et un couplage excitation-contraction efficace. Si les canaux sélectifs aux ions monovalents étaient absents aucun Ca^{2+} ne pourrait être libéré via les canaux Ca^{2+} du RS et aucune contraction ne s'en suivrait.

Canaux Calcique du RS (RyR)

Mis à part, la présence de canaux K^+ et Cl^- dans les membranes du RS auriculaire humain ou ovin, ces membranes montrent des sites de liaisons spécifiques à la [3H]-RyR qui doivent correspondre à des canaux calciques du RS. Ces canaux ont déjà été étudiés dans différentes conditions ioniques au niveau des muscles squelettiques et cardiaques (Lai et al., 1988a; Lai et al., 1988b; Liu et al., 1989; Liu et al., 1991). En absence de concentration mM de Ca^{2+} sur leur côté luminal, ces canaux, indépendamment de l'isoforme considérée, sont capables de conduire des cations monovalents tels le Cs^+ , K^+ ou le Na^+ (Lai et al., 1988a).

Les canaux Ca^{2+} du RS auriculaire humain et ovin ont été reconstitués en solution de KCl, KAcétate ou CsCl. Dans ces 2 cas, le K^+ et le Cs^+ agissent comme transporteurs de charges. De très grandes valeurs de conductance aux cations monovalents furent obtenues pour ces canaux au niveau auriculaire humain (Figure 22) et ovin (Figure 21), ce qui facilite leur enregistrement. Ces valeurs sont similaires à celles rapportées pour les canaux RyRs natifs et purifiés provenant de tissus ventriculaires (Anderson et al., 1989; Meissner, 1994). Cependant, il est à noter que les enregistrements de l'activité des canaux

ovins semblent posséder un mode de "gating" différent et plus rapide que ceux des canaux humains. De plus, le potentiel d'inversion qui fut déterminé pour le RyRs, autant humain (Figure 22) qu'ovin (Figure 21), est très près du potentiel d'équilibre du K^+ ou du Cs^+ (voir Annexe A) pour les conditions ioniques étudiées, ce qui rend compte de la sélectivité des canaux RyRs pour ces cations. Les canaux RyRs qui furent enregistrés démontrent des caractéristiques typiques du même type de canaux sur des tissus ventriculaires canins (Anderson et al., 1989).

De surcroît, il faut noter que nos études ont été réalisées en présence de $10\ \mu M$ de Ca^{2+}_{libre} où le RyR est connu pour être pleinement activé –RyR1 et RyR3 (Franzini-Armstrong et Protasi, 1997) ou le RyR2 (Figure 26).

Ces canaux RyRs exhibent des niveaux de sous-conductance (Figure 23) à $50\pm 5\%$ de l'amplitude de l'état complètement conducteur. Ces événements sont très courts et pour bien les observer, il a fallu utiliser une échelle de temps plus grande (Figure 23). Cependant, aucune étude quantitative n'a été faite de notre part sur ce sous-état. D'autres études ont démontré la présence de sous-états semblables chez l'activité de canaux RyRs: du diaphragme (Picher et al., 1997), des muscles squelettiques (Lai et al., 1988a) ou des tissus cardiaques ventriculaires (Anderson et al., 1989). (Rousseau et al., 1987) ont aussi démontré que la ryanodine avait pour effet de bloquer le RyR en une position sous-conductrice à 50% de l'état conducteur principale, ce qui vient appuyer l'existence de ce sous-état, inhérent à la structure même du complexe protéique.

L'addition de concentration mM d'ATP est connue pour activer les canaux RyRs des tissus ventriculaires (Anderson et al., 1989). Nous avons montré qu'une telle addition est aussi effective sur les tissus auriculaires humains (Figure 24) et ovins. Cette activation se traduit par l'augmentation de la P_O des canaux en présence de 2 mM d'ATP (Figure

24). Cet effet est conciliable avec l'effet attribué à l'AMP dans le tampon de liaison spécifique. Le RyR possède un site de liaison allostérique à l'adénosine lui permettant une meilleure activation par le Ca^{2+} en ouvrant le canal et laissant le site de liaison à la ryanodine se démasquer (stratégie utilisée dans les expériences de liaison à la [^3H]-ryanodine). D'un point de vue fonctionnel, l'ATP + Ca^{2+} augmente sa P_0 . Il faut spécifier que l'effet de l'ATP ne se fait pas via la phosphorylation du canal, du fait que l'AMP-PCP et l'ADP ont les mêmes propriétés.

Par contre, une phosphorylation des RyRs est également possible par l'action d'autres protéines telles la CaMKII (Witcher et al., 1991; Witcher et al., 1992), possiblement par la PKA (Valdivia et al., 1995), la PKG et PKC (Takasago et al., 1991).

L'ensemble de ces évidences appuient notre hypothèse d'une similarité fonctionnelle entre les RyRs ventriculaires et auriculaires.

Immunobuvardage western contre les RyRs

Il existe 3 isoformes de RyRs chez les mammifères. Les expériences d'immunobuvardage (Figure 25) effectuées sur différents tissus cardiaques issus de plusieurs espèces, ont montré quelle isoforme de RyR est prédominante au niveau du RS auriculaire humain, mais aussi chez d'autres mammifères tels le mouton ou le chien. En effet, les tissus cardiaques, autant auriculaires que ventriculaires, n'ont montré aucune immunoréactivité avec les anticorps dirigés contre le RyR1 et le RyR3. Cependant, ils ont tous deux marqué une bande de haut poids moléculaire (~600 kDa) avec l'anticorps contre le RyR de type 2.

D'autres bandes, de plus faible poids moléculaire, ont été observées au niveau des tissus cardiaques avec l'anti-RyR2 et aussi avec l'anti-RyR1 chez le muscle squelettique

de lapin. Ces bandes correspondraient à des fragments de RyRs protéolysés. En effet, il est connu que les RyRs ,particulièrement le RyR2, sont très sensibles à la protéolyse (Meissner et al., 1989). De plus, des bandes de faibles poids moléculaires sont visibles sur le western blots utilisant l'anti-RyR2 au niveau du muscle squelettique de lapin. Ces bandes seraient dues à une faible réaction de l'anticorps de RyR2 pour le RyR1. Les spécifications de l'anticorps (Affinity Bioreagents, MA3-916) font mention de cette faible réactivité de l'anti-RyR2 avec le RyR1.

La présence de réactivité de l'anti-RyR3 avec une protéine semblant être la myosine est intrigante, car celle-ci devrait être perçue pour tous les échantillons. Cet aspect reste encore nébuleux.

Les résultats négatifs d'immunobuvardage pour les RyR1 et RyR3 combinés aux résultats positifs pour le RyR2 nous indiquent, sans équivoque, que les canaux Ca^{2+} du RS auriculaire humain, canin ainsi qu'ovin, sont des RyR2 tout comme ceux présents au niveau ventriculaire. Ces observations sont confirmées par les expériences et résultats de northern blots, mRNA et d'hybridation *in situ* (Lompre et al., 1994).

Conclusion

Quoique les effets de la caféine et de la ryanodine sur la contraction des myocytes auriculaires de mammifères étant déjà démontrés, cette étude ajoute aux connaissances limitées quant à la présence et de la fonctionnalité du RS au niveau auriculaire. Longtemps, il a été considéré inexistant ou non fonctionnel. Cependant les résultats de nos travaux ainsi que ceux de plusieurs autres études (Bossen et al., 1981; Gorza et al., 1997; Luss et al., 1999; Minajeva et al., 1997) démontrent la présence de celui-ci ainsi que la fonctionnalité du RyR, le canal Ca^{2+} responsable de la libération du Ca^{2+} des réserves intracellulaires contenues dans le RS.

De plus, la présente étude est complémentaire à une autre (Luss et al., 1999) qui a montré la présence des protéines régulatrices du RS, i.e. la triadine, la junctine, la Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase (SERCA2) et le phospholamban, autant au niveau des tissus ventriculaires qu'auriculaires. En effet, nous venons de prouver, au niveau des tissus auriculaires, la présence du canal Ca^{2+} du RS –RyR–, une protéine essentielle à un RS fonctionnel, non seulement chez l'humain, mais au niveau d'autres mammifères supérieurs (ovins). Nous avons, de surcroît, prouvé biochimiquement, électrophysiologiquement ainsi qu'immunologiquement que l'isoforme de RyR présente dans les tissus auriculaires était le RyR2, celle-là même présente chez les ventricules des mammifères supérieurs.

Cette étude est également complémentaire aux études de *Minajeva et al.* et de *Gorza et al.* (Gorza et al., 1997; Minajeva et al., 1997) qui comparaient biochimiquement le RS des tissus auriculaires et ventriculaires de rat. Cependant, bien qu'elles démontrent, elles aussi, la présence d'un RS fonctionnel au niveau des cellules auriculaires de rat, elles

se contredisent l'une l'autre sur certains aspects quantitatifs et ne sont pas du tout en accord avec certains points qui furent publiés par *Lüss et al.* par la suite (Luss et al., 1999).

L'originalité de notre étude repose sur le fait que nous avons utilisé essentiellement du matériel auriculaire humain de très haute qualité (non ischémique, non anoxique, non infarcté) et que nous avons interrogé les propriétés des conductances ioniques impliquées dans la libération rapide du Ca^{2+} au niveau membranaire et moléculaire. Les études antérieures focalisaient beaucoup plus sur le repompage du Ca^{2+} par le RS ventriculaire/auriculaire (Koss et al., 1997).

Perspectives

Les différents résultats présentés ci-dessus nous ont mené à tenter de purifier le canal Ca^{2+} du RS auriculaire. L'expérience fut, tout d'abord, tentée au niveau des oreillettes de chien de manière à optimiser les manipulations, préalablement à l'application de la technique sur les tissus humains. Il fut possible de solubiliser et de purifier le RyR sur gradient de sucrose continu (voir matériel et méthodes). La reconstitution de ce canal à l'intérieur des BLPs fut cependant très ardue. Le détergent contenu dans la solution (CHAPS), brisait inévitablement la membrane artificielle ce qui rendait l'incorporation du canal dans la membrane et le maintien de l'intégrité de celle-ci difficiles.

Il serait éventuellement possible de dialyser la solution de RyR solubilisé de façon à éliminer optimalement le CHAPS qui y est contenu. Par la suite, il serait possible de réincorporer ces RyRs dans des liposomes pour ainsi former des protéoliposomes (Cladera et al., 1997) ce qui rendrait probablement la reconstitution de ce canal plus facile et effective.

Une autre avenue intéressante serait la microscopie électronique sur des tissus auriculaires humains dont le RS serait préalablement marqué spécifiquement (Sommer et Waugh, 1976). Cette méthode pourrait attester de la présence de RS, sa localisation et le type présent (jonctionnel, libre (corbulaire), présence relative de tubules T, etc.).

Les techniques d'hybridation *in situ*, d'immunobuvardage Northern et d'expériences de protection contre l'ARNase des oreillettes humaines pourraient être d'autres façons très intéressantes de montrer la présence et d'étudier la distribution des

RyRs et / ou de leur expression au niveau des différents types de myocytes. De plus, la co-localisation cellulaire des RyRs avec d'autres protéines (ex: DHPRs, Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPases etc.), serait envisageable. Ce type d'investigation permettrait de mieux comprendre la fonctionnalité des RyRs auriculaires humains. Il serait aussi possible de comparer les résultats obtenus en quantité d'ARNm ou de protéines avec des études qui ont été réalisées sur des rats et d'autres espèces animales (Minajeva et al., 1997). Cela permettrait de mieux comprendre l'implication de ces canaux RyRs dans le phénomène de transduction du signal entre la membrane sarcolemmale et celle du RS sur les cellules auriculaires humaines.

Minajeva et al. ont démontré la présence importante d'ARNm du récepteur à l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3R) sur des tissus auriculaires de rats (Minajeva et al., 1997). Leurs observations montrèrent aussi une ségrégation du IP3R, entre les oreillettes et les ventricules, liée à l'âge de ces rats. Des expériences de liaisons spécifiques, d'immunobuvardages western ou, comme le groupe de *Gorza et al.*, d'hybridations *in situ* et / ou d'expériences de protection contre l'ARNase seraient envisageables de manière à vérifier ce fait (quant à la différence topologique du moins) sur des tissus humains. L'observation de la présence du récepteur lui-même, ce qui s'avère plus physiologique que l'expression de l'ARNm serait elle aussi intéressante.

Des avenues sont aussi envisageables quant à l'étude des canaux K^+ du RS. En effet, la pharmacologie des canaux K^+ intracellulaires, ainsi que celle des canaux Cl^- intracellulaires, sont très mal connues. Notre équipe se suggère d'explorer cette avenue en comparant l'effet de certains bloqueurs et modulateurs de canaux K^+ de surface sur les canaux K^+ du RS auriculaire humain. Il serait aussi à vérifier si des molécules et drogues comme l'IBTX, la ChTX, la cromakalime, la dendrotoxine, le TEA ou certains anti-

arythmiques de type 3 auraient des effets non-négligeables sur ces canaux. En effet, il semble que les canaux de surface et les canaux du RS aient des empreintes pharmacologiques distinctes.

L'aspect physio-pathologique a aussi un intérêt certain. Il serait facilement concevable d'examiner séparément des échantillons auriculaires humains provenant de plusieurs patients et d'en étudier les différences en liaisons spécifiques, par exemple, selon l'utilisation de plusieurs agents (ryanodine, IP3, dihydropyridines, CSQ, anticorps etc.) pour ensuite effectuer une étude comparative en fonction des différentes pathologies et/ou phénotypes.

Des études fonctionnelles des canaux du RS nous permettraient aussi de pouvoir mieux étudier le phénomène de libération de Ca^{2+} chez des patients atteints d'arythmies. Ces études permettraient de mieux cerner le rôle de ce mécanisme de signalisation dans ces pathologies.

Annexe A

Équation de Nerst :

$\text{Cl}^- : Z = -1$, $\text{Cs}^+ : Z = +1$, $\text{K}^+ : Z = +1$

Pour des concentrations ioniques 50 / 250 mM *trans* / *cis*:

$$E_{\text{Cl}} = \frac{RT}{ZF} \frac{\ln[\text{Cl}^-]_o}{\ln[\text{Cl}^-]_i} = \frac{8.31 \frac{\text{J}}{\text{mol} \cdot \text{K}} \times 295 \text{ K}}{-(9.65 \times 10^4) \frac{\text{C}}{\text{mol}}} \times \frac{\ln[50]}{\ln[250]} = 35.8 \text{ mV} ,$$

note: $\frac{J}{C} \equiv V$, il s'agit ici de la vérification des dimensions de l'équation haute.

Nous avons aussi considéré une température de 295K correspondant à 20°C.

$$E_{\text{Cs}} = -35.8 \text{ mV} , \quad E_{\text{K}} = -35.8 \text{ mV}$$

Remerciements

Je tiens à remercier Dr Éric Rousseau qui m'a intégré dans l'équipe du Bilarium et m'a beaucoup aidé dans mon apprentissage de la Physiologie, la Biochimie et la Biophysique. J'ai beaucoup appris en votre présence et l'expérience que j'ai acquise avec vous m'a été des plus enrichissante.

Je veux remercier le Dr Javier Teixeira pour son apport essentiel à mon projet de recherche ainsi que de m'avoir permis d'assister à une opération à cœur ouvert; Cette expérience unique fut très intéressante et enrichissante.

Merci à Dr Luc Ruest, spécialiste des ryanoides qui nous a fait don de ryanodine, nous permettant l'étude des canaux Ca^{2+} du RS.

J'aimerais tout spécialement remercier Dr Céline Fiset, Dr Paul Pape et Dr Éric Rousseau pour avoir accepté de juger ce mémoire.

Merci aussi à toute l'équipe: Dany Salvail, Luc Picard, Barbara Renaudon, Anne Decrouy ainsi que tous les stagiaires qui ont séjourné avec nous au Bilarium. J'ai beaucoup profité à vous connaître autant scientifiquement que personnellement. Un gros merci à Catherine Benoit ma partenaire de cours et de maîtrise qui m'a été de bons conseils autant dans ma vie personnelle que scientifique.

J'aimerais remercier Sonia Proteau qui m'a beaucoup appris au niveau des différentes techniques et qui a été "patiente" malgré mes nombreuses bévues à mes débuts et qui m'a fait profiter de sa gentillesse jours après jours.

Ah oui! Félicitation aux nouveaux parents Dany et Sonia qui furent très productifs durant mes deux années avec eux (2 bébés chacun).

J'aimerais aussi remercier Mme Denise Lamontagne et Louise Picard pour leur assistance clinique et stratégique ainsi que les gens de la salle d'opération pour leur aide logistique. Mes recherches furent subventionnées par la Fondation des Maladies du Cœur du Québec (FMCQ).

Bibliographie

Adachi-Akahane, S., Cleemann, L., and Morad, M. Cross-signaling between L-type Ca^{2+} channels and ryanodine receptors in rat ventricular myocytes. *Journal of General Physiology* 1996;108:435-454.

Al Saady, N. M., Obel, O. A., and Camm, A. J. Left atrial appendage: structure, function, and role in thromboembolism. *Heart* 1999;82:547-554.

Anderson, K., Lai, F. A., Liu, Q. Y., Rousseau, E., Erickson, H. P., and Meissner, G. Structural and functional characterization of the purified cardiac ryanodine receptor- Ca^{2+} release channel complex. *Journal of Biological Chemistry* 1989;264:1329-1335.

Anzai, K., Takano, C., Tanaka, K., and Kirino, Y. Asymmetrical lipid charge changes the subconducting state of the potassium channel from sarcoplasmic reticulum. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 1994;199:1081-1087.

Bossen, E. H., Sommer, J. R., and Waugh, R. A. Comparative stereology of mouse atria. *Tissue & Cell* 1981;13:71-77.

Brillantes, A. B., Ondrias, K., Scott, A., Kobrinsky, E., Ondriasova, E., Moschella, M. C., Jayaraman, T., Landers, M., Ehrlich, B. E., and Marks, A. R. Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell* 1994;77:513-523.

Brillantes, A. M., Allen, P., Takahashi, T., Izumo, S., and Marks, A. R. Differences in cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) expression in

myocardium from patients with end-stage heart failure caused by ischemic versus dilated cardiomyopathy [published erratum appears in Circ Res 1992 Dec;71(6):1538]. Circulation Research 1992;71:18-26.

Buck, E., Zimanyi, I., Abramson, J. J., and Pessah, I. N. Ryanodine stabilizes multiple conformational states of the skeletal muscle calcium release channel. Journal of Biological Chemistry 1992;267:23560-23567.

Chabot, H. Étude des canaux potassiques du reticulum sarcoplasmique des cellules ventriculaires de chien et des muscles squelettiques de lapin. (Mémoire de Maîtrise de l'Université de Sherbrooke) 1993; pp. 131.

Cladera, J., Rigaud, J. L., Villaverde, J., and Dunach, M. Liposome solubilization and membrane protein reconstitution using Chaps and Chapso. European Journal of Biochemistry 1997;243:798-804.

Conti, A., Gorza, L., and Sorrentino, V. Differential distribution of ryanodine receptor type 3 (RyR3) gene product in mammalian skeletal muscles. Biochemical Journal 1996;316:19-23.

Cornea, R. L., Jones, L. R., Autry, J. M., and Thomas, D. D. Mutation and phosphorylation change the oligomeric structure of phospholamban in lipid bilayers. Biochemistry 1997;36:2960-2967.

Coronado, R. and Miller, C. Decamethonium and hexamethonium block K^+ channels of sarcoplasmic reticulum. Nature 1980;288:495-497.

Coronado, R., Rosenberg, R. L., and Miller, C. Ionic selectivity, saturation, and block in a K^+ -selective channel from sarcoplasmic reticulum. *Journal of General Physiology* 1980;76:425-446.

Decrouy, A., Juteau, M., Proteau, S., Teijeira, J., and Rousseau, E. Biochemical regulation of sarcoplasmic reticulum Cl^- channel from human atrial myocytes: involvement of phospholamban. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology* 1996;28:767-780.

Decrouy, A., Juteau, M., and Rousseau, E. Examination of the role of phosphorylation and phospholamban in the regulation of the cardiac sarcoplasmic reticulum Cl^- channel. *Journal of Membrane Biology* 1995;146:315-326.

DiFrancesco, D. The contribution of the 'pacemaker' current (if) to generation of spontaneous activity in rabbit sino-atrial node myocytes. *J Physiol (Lond)* 1991;434:23-40.

Dumoulin, M., Salvail, D., Gaudreault, S. B., Cadieux, A., and Rousseau, E. Epoxyeicosatrienoic acids relax airway smooth muscles and directly activate reconstituted KCa channels. *American Journal of Physiology* 1998;275:L423-L431.

Edes, I and Kranias, E. G. Ca^{2+} -ATPases/Pumps. In: Sperelakis N, eds. *Cell Physiology*, 2nd ed. Toronto: Academic Press, 1998:225-236

Fabiato, A. Computer programs for calculating total from specified free or free from specified total ionic concentrations in aqueous solutions containing multiple metals and ligands. *Methods in Enzymology* 1988;157:378-417.

Franzini-Armstrong, C. The sarcoplasmic reticulum and the control of muscle contraction. *FASEB Journal* 1999;13 Suppl 2:S266-S270.

Franzini-Armstrong, C. and Protasi, F. Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions. *Physiological Reviews* 1997;77:699-729.

Go, L. O., Moschella, M. C., Watras, J., Handa, K. K., Fyfe, B. S., and Marks, A. R. Differential regulation of two types of intracellular calcium release channels during end-stage heart failure. *Journal of Clinical Investigation* 1995;95:888-894.

Gorza, L., Vettore, S., Tessaro, A., Sorrentino, V., and Vitadello, M. Regional and age-related differences in mRNA composition of intracellular Ca^{2+} -release channels of rat cardiac myocytes. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology* 1997;29:1023-1036.

Gyorke, I. and Gyorke, S. Regulation of the cardiac ryanodine receptor channel by luminal Ca^{2+} involves luminal Ca^{2+} sensing sites. *Biophysical Journal* 1998;75:2801-2810.

Hakamata, Y., Nakai, J., Takeshima, H., and Imoto, K. Primary structure and distribution of a novel ryanodine receptor/calcium release channel from rabbit brain. *FEBS Letters* 1992;312:229-235.

Hashida, H., Hamada, M., and Hiwada, K. Serial changes in sarcoplasmic reticulum gene expression in volume-overloaded cardiac hypertrophy in the rat: effect of an angiotensin II receptor antagonist. *Clinical Science* 1999;96:387-395.

Heiny, JA. Excitation-Contraction Coupling in Skeletal Muscle. In: Sperelakis N, eds. Cell Physiology, 2nd ed. Toronto: Academic Press, 1998:805-816

Hill, J. A., Jr., Coronado, R., and Strauss, H. C. Potassium channel of cardiac sarcoplasmic reticulum is a multi- ion channel. Biophysical Journal 1989;55:35-45.

Hill, J. A., Jr., Coronado, R., and Strauss, H. C. Open-channel subconductance state of K⁺ channel from cardiac sarcoplasmic reticulum. American Journal of Physiology 1990;258:H159-H164.

Hirashima, N., Ishibashi, H., and Kirino, Y. Comparative electrophysiological study of reconstituted giant vesicle preparations of the rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum K⁺ channel. Biochimica et Biophysica Acta 1991;1067:235-240.

Hittinger, L., Ghaleh, B., Chen, J., Edwards, J. G., Kudej, R. K., Iwase, M., Kim, S. J., Vatner, S. F., and Vatner, D. E. Reduced subendocardial ryanodine receptors and consequent effects on cardiac function in conscious dogs with left ventricular hypertrophy. Circulation Research 1999;84:999-1006.

Hohenegger, M. and Suko, J. Phosphorylation of the purified cardiac ryanodine receptor by exogenous and endogenous protein kinases. Biochemical Journal 1993;296:303-308.

Holmberg, S. R. and Williams, A. J. Single channel recordings from human cardiac sarcoplasmic reticulum. Circulation Research 1989;65:1445-1449.

Hugnot, J. P., Salinas, M., Lesage, F., Guillemare, E., de Weille, J., Heurteaux, C., Mattei, M. G., and Lazdunski, M. Kv8.1, a new neuronal potassium channel subunit with

specific inhibitory properties towards Shab and Shaw channels. *EMBO Journal* 1996;15:3322-3331.

Ide, T., Morita, T., Kawasaki, T., Taguchi, T., and Kasai, M. Purification of a $K^{(+)}$ -channel protein of sarcoplasmic reticulum by assaying the channel activity in the planar lipid bilayer system. *Biochimica et Biophysica Acta* 1991;1067:213-220.

Jones, L. R., Zhang, L., Sanborn, K., Jorgensen, A. O., and Kelley, J. Purification, primary structure, and immunological characterization of the 26-kDa calsequestrin binding protein (junctin) from cardiac junctional sarcoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* 1995;270:30787-30796.

Jorgensen, A. O., Shen, A. C., Daly, P., and MacLennan, D. H. Localization of Ca^{2+} + Mg^{2+} -ATPase of the sarcoplasmic reticulum in adult rat papillary muscle. *Journal of Cell Biology* 1982a;93:883-892.

Jorgensen, A. O., Shen, A. C., MacLennan, D. H., and Tokuyasu, K. T. Ultrastructural localization of the Ca^{2+} + Mg^{2+} -dependent ATPase of sarcoplasmic reticulum in rat skeletal muscle by immunoferritin labeling of ultrathin frozen sections. *Journal of Cell Biology* 1982b;92:409-416.

Kadambi, V. J. and Kranias, E. G. Phospholamban: a protein coming of age. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 1997;239:1-5.

Kargacin, G. J., Ali, Z., and Kargacin, M. E. Ruthenium red reduces the Ca^{2+} sensitivity of Ca^{2+} uptake into cardiac sarcoplasmic reticulum. *Pflugers Archiv - European Journal of Physiology* 1998;436:338-342.

Kawano, S., Kuruma, A., Hirayama, Y., and Hiraoka, M. Anion permeability and conduction of adenine nucleotides through a chloride channel in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* 1999;274:2085-2092.

Kawano, S., Nakamura, F., Tanaka, T., and Hiraoka, M. Cardiac sarcoplasmic reticulum chloride channels regulated by protein kinase A. *Circulation Research* 1992;71:585-589.

Klein, M. G., Lacampagne, A., and Schneider, M. F. Voltage dependence of the pattern and frequency of discrete Ca^{2+} release events after brief repriming in frog skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997;94:11061-11066.

Knudson, C. M., Stang, K. K., Jorgensen, A. O., and Campbell, K. P. Biochemical characterization of ultrastructural localization of a major junctional sarcoplasmic reticulum glycoprotein (triadin). *Journal of Biological Chemistry* 1993b;268:12637-12645.

Knudson, C. M., Stang, K. K., Moomaw, C. R., Slaughter, C. A., and Campbell, K. P. Primary structure and topological analysis of a skeletal muscle-specific junctional sarcoplasmic reticulum glycoprotein (triadin). *Journal of Biological Chemistry* 1993a;268:12646-12654.

Koss, K. L., Grupp, I. L., and Kranias, E. G. The relative phospholamban and SERCA2 ratio: a critical determinant of myocardial contractility. *Basic Research In Cardiology* 1997;92:Suppl-24.

Kourie, J. I. ATP-sensitive voltage- and calcium-dependent chloride channels in sarcoplasmic reticulum vesicles from rabbit skeletal muscle. *Journal of Membrane Biology* 1997a;157:39-51.

Kourie, J. I. Chloride channels in the sarcoplasmic reticulum of muscle. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* 1997b;68:263-300.

Kourie, J. I. pH-modulation of chloride channels from the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Journal of Membrane Biology* 1999;167:73-83.

Kourie, J. I., Laver, D. R., Ahern, G. P., and Dulhunty, A. F. A calcium-activated chloride channel in sarcoplasmic reticulum vesicles from rabbit skeletal muscle. *American Journal of Physiology* 1996b;270:t-86.

Kourie, J. I., Laver, D. R., Junankar, P. R., Gage, P. W., and Dulhunty, A. F. Characteristics of two types of chloride channel in sarcoplasmic reticulum vesicles from rabbit skeletal muscle. *Biophysical Journal* 1996a;70:202-221.

Kovacs, R. J., Nelson, M. T., Simmerman, H. K., and Jones, L. R. Phospholamban forms Ca^{2+} -selective channels in lipid bilayers. *Journal of Biological Chemistry* 1988;263:18364-18368.

Lai, F. A., Anderson, K., Rousseau, E., Liu, Q. Y., and Meissner, G. Evidence for a Ca^{2+} channel within the ryanodine receptor complex from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 1988b;151:441-449.

Lai, F. A., Erickson, H. P., Rousseau, E., Liu, Q. Y., and Meissner, G. Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature* 1988a;331:315-319.

Lee, K. S., Marban, E., and Tsien, R. W. Inactivation of calcium channels in mammalian heart cells: joint dependence on membrane potential and intracellular calcium. *Journal of Physiology* 1985;364:395-411.

Leong, P. and MacLennan, D. H. A 37-amino acid sequence in the skeletal muscle ryanodine receptor interacts with the cytoplasmic loop between domains II and III in the skeletal muscle dihydropyridine receptor. *Journal of Biological Chemistry* 1998b;273:7791-7794.

Leong, P. and MacLennan, D. H. Complex interactions between skeletal muscle ryanodine receptor and dihydropyridine receptor proteins. *Biochemistry and Cell Biology* 1998a;76:681-694.

Liu, Q. Y., Lai, F. A., Rousseau, E., Jones, R. V., and Meissner, G. Multiple conductance states of the purified calcium release channel complex from skeletal sarcoplasmic reticulum. *Biophysical Journal* 1989;55:415-424.

Liu, Q. Y., Lai, F. A., Shen, W. K., Meissner, G., and Strauss, H. C. Reconstitution of the solubilized cardiac sarcoplasmic reticulum potassium channel. Identification of a putative Mr approximately 80 kDa polypeptide constituent. *FEBS Letters* 1991;291:13-16.

Liu, Q. Y., Rasmusson, R. L., Liu, Q. X., and Strauss, H. C. Voltage-dependent, open channel blockade of the cardiac sarcoplasmic reticulum potassium channel by 4-aminopyridine. *Canadian Journal of Cardiology* 1998;14:275-280.

Lompre, A. M., Anger, M., and Levitsky, D. Sarco(endo)plasmic reticulum calcium pumps in the cardiovascular system: function and gene expression. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology* 1994;26:1109-1121.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. Protein measurement with Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 1951;193:265-275.

Lu, X., Xu, L., and Meissner, G. Activation of the skeletal muscle calcium release channel by a cytoplasmic loop of the dihydropyridine receptor. *Journal of Biological Chemistry* 1994;269:6511-6516.

Lu, X., Xu, L., and Meissner, G. Phosphorylation of dihydropyridine receptor II-III loop peptide regulates skeletal muscle calcium release channel function. Evidence for an essential role of the beta-OH group of Ser687. *Journal of Biological Chemistry* 1995;270:18459-18464.

Lugnier, C., Muller, B., Le Bec, A., Beaudry, C., and Rousseau, E. Characterization of indolidan- and rolipram-sensitive cyclic nucleotide phosphodiesterases in canine and human cardiac microsomal fractions. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 1993;265:1142-1151.

Luss, I., Boknik, P., Jones, L. R., Kirchhefer, U., Knapp, J., Linck, B., Luss, H., Meissner, A., Muller, F. U., Schmitz, W., Vahlensieck, U., and Neumann, J. Expression of cardiac calcium regulatory proteins in atrium v ventricle in different species. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology* 1999;31:1299-1314.

Ma, J. Block by ruthenium red of the ryanodine-activated calcium release channel of skeletal muscle. *Journal of General Physiology* 1993;102:1031-1056.

Marks, A. R., Tempst, P., Hwang, K. S., Taubman, M. B., Inui, M., Chadwick, C., Fleischer, S., and Nadal-Ginard, B. Molecular cloning and characterization of the ryanodine receptor/junctional channel complex cDNA from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989;86:8683-8687.

Marx, S. O., Ondrias, K., and Marks, A. R. Coupled gating between individual skeletal muscle Ca^{2+} release channels (ryanodine receptors). *Science* 1998;281:818-821.

Masaki, H., Sato, Y., Luo, W., Kranias, E. G., and Yatani, A. Phospholamban deficiency alters inactivation kinetics of L-type Ca^{2+} channels in mouse ventricular myocytes. *American Journal of Physiology* 1997;272:t-12.

Meissner, G. Adenine nucleotide stimulation of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in sarcoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* 1984;259:2365-2374.

Meissner, G. Ryanodine receptor/ Ca^{2+} release channels and their regulation by endogenous effectors. *Annual Review of Physiology* 1994;56:485-508.

Meissner, G., Darling, E., and Eveleth, J. Kinetics of rapid Ca^{2+} release by sarcoplasmic reticulum. Effects of Ca^{2+} , Mg^{2+} , and adenine nucleotides. *Biochemistry* 1986;25:236-244.

Meissner, G., Rousseau, E., and Lai, F. A. Structural and functional correlation of the trypsin-digested Ca^{2+} release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* 1989;264:1715-1722.

Mercadier, J. J., Lompre, A. M., Duc, P., Boheler, K. R., Fraysse, J. B., Wisnewsky, C., Allen, P. D., Komajda, M., and Schwartz, K. Altered sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase gene expression in the human ventricle during end-stage heart failure. *Journal of Clinical Investigation* 1990;85:305-309.

Meyers, M. B., Pickel, V. M., Sheu, S. S., Sharma, V. K., Scotto, K. W., and Fishman, G. I. Association of sorcin with the cardiac ryanodine receptor. *Journal of Biological Chemistry* 1995;270:26411-26418.

Minajeva, A., Kaasik, A., Paju, K., Seppet, E., Lompre, A. M., Veksler, V., and Ventura-Clapier, R. Sarcoplasmic reticulum function in determining atrioventricular contractile differences in rat heart. *American Journal of Physiology* 1997;273:t-507.

Murayama, T., Oba, T., Katayama, E., Oyamada, H., Oguchi, K., Kobayashi, M., Otsuka, K., and Ogawa, Y. Further characterization of the type 3 ryanodine receptor (RyR3) purified from rabbit diaphragm. *Journal of Biological Chemistry* 1999;274:17297-17308.

Murayama, T. and Ogawa, Y. Characterization of type 3 ryanodine receptor (RyR3) of sarcoplasmic reticulum from rabbit skeletal muscles. *Journal of Biological Chemistry* 1997;272:24030-24037.

Murphy, E., Steenbergen, C., Levy, L. A., Raju, B., and London, R. E. Cytosolic free magnesium levels in ischemic rat heart. *Journal of Biological Chemistry* 1989;264:5622-5627.

Nakai, J., Imagawa, T., Hakamat, Y., Shigekawa, M., Takeshima, H., and Numa, S. Primary structure and functional expression from cDNA of the cardiac ryanodine receptor/calcium release channel. *FEBS Letters* 1990;271:169-177.

Opie, L. H. *The heart; Physiology, from cell to circulation*. 3rd, New-York: 1998

Otsu, K., Willard, H. F., Khanna, V. K., Zorzato, F., Green, N. M., and MacLennan, D. H. Molecular cloning of cDNA encoding the Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* 1990;265:13472-13483.

Pessah, I. N. and Zimanyi, I. Characterization of multiple [3H]ryanodine binding sites on the Ca^{2+} release channel of sarcoplasmic reticulum from skeletal and cardiac muscle: evidence for a sequential mechanism in ryanodine action. *Molecular Pharmacology* 1991;39:679-689.

Picher, M., Decrouy, A., Proteau, S., and Rousseau, E. Conducting and voltage-dependent behaviors of the native and purified SR Ca^{2+} -release channels from the canine diaphragm. *Biochimica et Biophysica Acta* 1997;1328:243-260.

Picher, M., Decrouy, A., and Rousseau, E. Conducting and voltage-dependent behaviors of potassium ion channels reconstituted from diaphragm sarcoplasmic reticulum: comparison with the cardiac isoform. *Biochimica et Biophysica Acta* 1996;1279:93-103.

Rardon, D. P., Cefali, D. C., Mitchell, R. D., Seiler, S. M., Hathaway, D. R., and Jones, L. R. Digestion of cardiac and skeletal muscle junctional sarcoplasmic reticulum vesicles with calpain II. Effects on the Ca^{2+} release channel. *Circulation Research* 1990;67:84-96.

Rousseau, E. Single chloride-selective channel from cardiac sarcoplasmic reticulum studied in planar lipid bilayers. *Journal of Membrane Biology* 1989;110:39-47.

Rousseau, E. and Chabot, H. Identification fonctionnelle du canal calcique du réticulum sarcoplasmique. *Médecine Science* 1992;8:950-957.

Rousseau, E., Chabot, H., Beaudry, C., and Muller, B. Reconstitution and regulation of cation-selective channels from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Molecular & Cellular Biochemistry* 1992;114:109-117.

Rousseau, E., Ladine, J., Liu, Q. Y., and Meissner, G. Activation of the Ca^{2+} release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by caffeine and related compounds. *Archives of Biochemistry & Biophysics* 1988a;267:75-86.

Rousseau, E. and Meissner, G. Single cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -release channel: activation by caffeine. *American Journal of Physiology* 1989;256:H328-H333.

Rousseau, E. and Pinkos, J. pH modulates conducting and gating behaviour of single calcium release channels. *Pflugers Archiv - European Journal of Physiology* 1990;415:645-647.

Rousseau, E., Roberson, M., and Meissner, G. Properties of single chloride selective channel from sarcoplasmic reticulum. *European Biophysics Journal* 1988b;16:143-151.

Rousseau, E., Smith, J. S., Henderson, J. S., and Meissner, G. Single channel and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ flux measurements of the cardiac sarcoplasmic reticulum calcium channel. *Biophysical Journal* 1986;50:1009-1014.

Rousseau, E., Smith, J. S., and Meissner, G. Ryanodine modifies conductance and gating behavior of single Ca^{2+} release channel. *American Journal of Physiology* 1987;253:C364-C368.

Salvail, D., Dumoulin, M., and Rousseau, E. Direct modulation of tracheal Cl^- channel activity by 5,6- and 11,12-EET. *American Journal of Physiology* 1998;275:L432-L441.

Scott, B. T., Simmerman, H. K., Collins, J. H., Nadal-Ginard, B., and Jones, L. R. Complete amino acid sequence of canine cardiac calsequestrin deduced by cDNA cloning. *Journal of Biological Chemistry* 1988;263:8958-8964.

Sham, J. S., Song, L. S., Chen, Y., Deng, L. H., Stern, M. D., Lakatta, E. G., and Cheng, H. Termination of Ca^{2+} release by a local inactivation of ryanodine receptors in

cardiac myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95:15096-15101.

Sharma, M. R., Penczek, P., Grassucci, R., Xin, H. B., Fleischer, S., and Wagenknecht, T. Cryoelectron microscopy and image analysis of the cardiac ryanodine receptor. *Journal of Biological Chemistry* 1998;273:18429-18434.

Shen, W. K., Rasmusson, R. L., Liu, Q. Y., Crews, A. L., and Strauss, H. C. Voltage and temperature dependence of single K^+ channels isolated from canine cardiac sarcoplasmic reticulum. *Biophysical Journal* 1993;65:747-754.

Shou, W. N., Aghdasi, B., Armstrong, D. L., Guo, Q. X., Bao, S. D., Charng, M. J., Mathews, L. M., Schneider, M. D., Hamilton, S. L., and Matzuk, M. M. Cardiac defects and altered ryanodine receptor function in mice lacking FKBP12. *Nature* 1998;391:489-492.

Simmerman, H. K., Kobayashi, Y. M., Autry, J. M., and Jones, L. R. A leucine zipper stabilizes the pentameric membrane domain of phospholamban and forms a coiled-coil pore structure. *Journal of Biological Chemistry* 1996;271:5941-5946.

Sipido, K. R., Callewaert, G., and Carmeliet, E. Inhibition and rapid recovery of Ca^{2+} current during Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum in guinea pig ventricular myocytes. *Circulation Research* 1995;76:102-109.

Sitsapesan, R. and Williams, A. J. Regulation of current flow through ryanodine receptors by luminal Ca^{2+} . *Journal of Membrane Biology* 1997;159:179-185.

Smith, J. S., Imagawa, T., Ma, J., Fill, M., Campbell, K. P., and Coronado, R. Purified ryanodine receptor from rabbit skeletal muscle is the calcium-release channel of sarcoplasmic reticulum. *Journal of General Physiology* 1988;92:1-26.

Sommer, J. R. and Waugh, R. A. The ultrastructure of the mammalian cardiac muscle cell—with special emphasis on the tubular membrane systems. A review. *American Journal of Pathology* 1976;82:192-232.

Sonnleitner, A., Conti, A., Bertocchini, F., Schindler, H., and Sorrentino, V. Functional properties of the ryanodine receptor type 3 (RyR3) Ca^{2+} release channel. *EMBO Journal* 1998;17:2790-2798.

Sorota, S. Insights into the structure, distribution and function of the cardiac chloride channels. *Cardiovascular Research* 1999;42:361-376.

Stocker, M. and Kerscheneiner, D. Cloning and tissue distribution of two new potassium channel alpha- subunits from rat brain. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 1998;248:927-934.

Suko, J., Maurer-Fogy, I., Plank, B., Bertel, O., Wyskovsky, W., Hohenegger, M., and Hellmann, G. Phosphorylation of serine 2843 in ryanodine receptor-calcium release channel of skeletal muscle by cAMP-, cGMP- and CaM-dependent protein kinase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1993;1175:193-206.

Sun, H., Leblanc, N., and Nattel, S. Mechanisms of inactivation of L-type calcium channels in human atrial myocytes. *American Journal of Physiology* 1997;272:t-35.

Sutko, J. L., Airey, J. A., Welch, W., and Ruest, L. The pharmacology of ryanodine and related compounds. *Pharmacological Reviews* 1997;49:53-98.

Takahashi, T., Allen, P. D., Lacro, R. V., Marks, A. R., Dennis, A. R., Schoen, F. J., Grossman, W., Marsh, J. D., and Izumo, S. Expression of dihydropyridine receptor (Ca^{2+} channel) and calsequestrin genes in the myocardium of patients with end-stage heart failure. *Journal of Clinical Investigation* 1992;90:927-935.

Takasago, T., Imagawa, T., Furukawa, K., Ogurusu, T., and Shigekawa, M. Regulation of the cardiac ryanodine receptor by protein kinase-dependent phosphorylation. *Journal of Biochemistry* 1991;109:163-170.

Takeshima, H., Nishimura, S., Matsumoto, T., Ishida, H., Kangawa, K., Minamino, N., Matsuo, H., Ueda, M., Hanaoka, M., and Hirose, T. Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature* 1989;339:439-445.

Tanifuji, M., Sokabe, M., and Kasai, M. An anion channel of sarcoplasmic reticulum incorporated into planar lipid bilayers: single-channel behavior and conductance properties. *Journal of Membrane Biology* 1987;99:103-111.

Tortora, G. J. and Grabowski, S. R. *Principes d'anatomie et de physiologie*. Collégial et Universitaire, Anjou: 1994

Treves, S., Chiozzi, P., and Zorzato, F. Identification of the domain recognized by anti-(ryanodine receptor) antibodies which affect Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release. *Biochemical Journal* 1993;291:757-763.

Tunwell, R. E., Wickenden, C., Bertrand, B. M., Shevchenko, V. I., Walsh, M. B., Allen, P. D., and Lai, F. A. The human cardiac muscle ryanodine receptor-calcium release channel: identification, primary structure and topological analysis. *Biochemical Journal* 1996;318:477-487.

Valdivia, H. H. Modulation of intracellular Ca^{2+} levels in the heart by sorcin and FKBP12, two accessory proteins of ryanodine receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* 1998;19:479-482.

Valdivia, H. H., Kaplan, J. H., Ellis-Davies, G. C., and Lederer, W. J. Rapid adaptation of cardiac ryanodine receptors: modulation by Mg^{2+} and phosphorylation. *Science* 1995;267:1997-2000.

Veinot, J. P., Harrity, P. J., Gentile, F., Khandheria, B. K., Bailey, K. R., Eickholt, J. T., Seward, J. B., Tajik, A. J., and Edwards, W. D. Anatomy of the normal left atrial appendage: a quantitative study of age-related changes in 500 autopsy hearts: implications for echocardiographic examination. *Circulation* 1997;96:3112-3115.

Witcher, D. R., Kovacs, R. J., Schulman, H., Cefali, D. C., and Jones, L. R. Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity. *Journal of Biological Chemistry* 1991;266:11144-11152.

Witcher, D. R., Striffler, B. A., and Jones, L. R. Cardiac-specific phosphorylation site for multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase is conserved in the brain ryanodine receptor. *Journal of Biological Chemistry* 1992;267:4963-4967.

Xu, L., Mann, G., and Meissner, G. Regulation of cardiac Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) by Ca^{2+} , H^{+} , Mg^{2+} , and adenine nucleotides under normal and simulated ischemic conditions. *Circulation Research* 1996;79:1100-1109.

Xu, L. and Meissner, G. Regulation of cardiac muscle Ca^{2+} release channel by sarcoplasmic reticulum lumenal Ca^{2+} . *Biophysical Journal* 1998;75:2302-2312.

Yano, K. and Zarain-Herzberg, A. Sarcoplasmic reticulum calsequestrins: structural and functional properties. *Molecular & Cellular Biochemistry* 1994;135:61-70.

Zarka, A. and Shoshan-Barmatz, V. Characterization and photoaffinity labeling of the ATP binding site of the ryanodine receptor from skeletal muscle. *European Journal of Biochemistry* 1993;213:147-154.

Zhang, L., Kelley, J., Schmeisser, G., Kobayashi, Y. M., and Jones, L. R. Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. Proteins of the cardiac junctional sarcoplasmic reticulum membrane. *Journal of Biological Chemistry* 1997;272:23389-23397.

Zorzato, F., Fujii, J., Otsu, K., Phillips, M., Green, N. M., Lai, F. A., Meissner, G., and MacLennan, D. H. Molecular cloning of cDNA encoding human and rabbit forms of the Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* 1990;265:2244-2256.

Zucchi, R. and Ronca-Testoni, S. The sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. *Pharmacological Reviews* 1997;49:1-51.